

Translation of Japanese Patent Kokai No 170,977/95

AD

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Maltose-trehalose converting enzyme, and its preparation and uses

[Claims] 1. A maltose-trehalose converting enzyme which converts maltose into trehalose and vice versa.

2. The enzyme as claimed in claim 1, which is derived from a microorganism.

3. The enzyme as claimed in claim 2, wherein said microorganism is a member selected from the group consisting of those of the genera *Pimelobacter*, *Pseudomonas* and *Thermus*.

4. A maltose-trehalose converting enzyme which has the following physicochemical properties:

(1) Action

Converting maltose into trehalose and vice versa;

(2) Molecular weight

About 57,000-120,000 daltons on sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(3) Isoelectric point (pI)

About 3.8-5.1 on isoelectrophoresis using ampholyte;

(4) Inhibition of activity

Being inhibited by one mM Cu⁺⁺, 50 mM Tris-HCl buffer; and

(5) Origin

Derived from microorganisms.

5. The enzyme as claimed in claim 4, which is derived from a microorganism selected from the group consisting of those of the genera *Pimelobacter*, *Pseudomonas* and *Thermus aquaticus*, wherein the enzyme derived from a microorganism of the genus *Pimelobacter* has the following physicochemical properties:

(1) Optimum temperature

About 20°C when incubated at a pH 7.0 for 60 min;

(2) Optimum pH

A pH of about 7.0-8.0 when incubated at 25°C for 60 min;

(3) Thermal stability

Stable up to about 30°C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(4) pH Stability

Stable at a pH of about 6.0-9.5 when incubated at 20°C for 60 min;

the enzyme derived from a microorganism of the genus *Pseudomonas* has the following physicochemical properties:

(1) Optimum temperature

About 37°C when incubated at pH 7.0 for 60 min;

(2) Optimum pH

A pH of about 7.3-8.3 when incubated at 35°C for 60 min;

(3) Thermal stability

Stable up to about 40°C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(4) pH Stability

Stable at a pH of about 6.0-9.5 when incubated at 35°C for 60 min;

and the enzyme derived from a microorganism of the genus *Thermus* has the following physicochemical properties:

(1) Optimum temperature

About 65°C when incubated at pH 7.0 for 60 min;

(2) Optimum pH

A pH of about 6.0-6.7 when incubated at 60°C for 60 min;

(3) Thermal stability

Stable up to a temperature of about 80°C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(4) pH Stability

Stable at a pH of about 5.5-9.5 when incubated at 60°C for 60 min.

6. An enzyme which converts maltose into trehalose and vice versa and has a partial amino acid sequence selected from the group consisting of:

(1) Trp-X₁-Arg-X₂-Ala-X₃-Phe

(where "X₁" means "Phe" or "Pro"; "X₂", "Thr" or "Pro"; and "X₃", "Val" or "Ala"); and

(2) Ala-Val-X₄-Tyr

(where "X₄" means "Phe" or "Ile")

7. A process for preparing maltose-trehalose converting enzyme, characterized in that it comprises culturing in a nutrient culture medium a

microorganism capable of producing a maltose-trehalose converting enzyme to form said enzyme, and recovering said enzyme from the resultant culture.

8. The process as claimed in claim 7, wherein said microorganism is a member selected from the group consisting of those of the species *Pimelobacter* sp. R48 (FERM BP-4315) deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan; *Pseudomonas putida* H262 (FERM BP-4579) deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan; and *Thermus aquaticus* (ATCC 33923).

9. A microorganism, capable of forming a maltose-trehalose converting enzyme which converts maltose into trehalose and vice versa, selected from the group consisting of those of the species *Pimelobacter* sp. R48 (FERM BP-4315) deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan; and *Pseudomonas putida* H262 (FERM BP-4579) deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan.

10. A method to lower the reducing power of maltose, characterized in that it contains a step of allowing a maltose-trehalose converting enzyme, which converts maltose into trehalose and vice versa, to act on a maltose solution.

11. A trehalose or a saccharide composition containing the same which is obtained by allowing a maltose-

trehalose converting enzyme, which converts maltose into trehalose and vice versa, to act on a maltose solution.

12. The trehalose or the saccharide composition as claimed in claim 11, wherein said maltose solution is prepared by allowing β -amylase together with or without a starch debranching enzyme to act on a solution of amylaceous substance.

13. The trehalose as claimed in claim 11 or 12, characterized in that the purity of trehalose has been improved by allowing a maltose-trehalose converting enzyme, which converts maltose into trehalose and vice versa, to act on a maltose solution, or subjecting the resultant solution to the action of glucoamylase to obtain a trehalose solution, and column chromatographing the trehalose solution on a column of a strong-acid cation exchanger.

14. The trehalose as claimed in claim 11, 12 or 13, characterized in that it is hydrous crystalline trehalose or anhydrous crystalline trehalose.

15. A composition which contains either a trehalose prepared by allowing a maltose-trehalose converting enzyme, which converts maltose into trehalose and vice versa, to act on a maltose solution, or a saccharide composition containing said trehalose.

16. The composition as claimed in claim 15, which is a food product, a cosmetic composition or a pharmaceutical composition.

17. The composition as claimed in claim 15 or 16, which is a composition for supplementing energy to a living body.

[Detailed Description of the Invention]

[Field of the Invention]

The present invention relates to a maltose-trehalose converting enzyme, and its preparation and uses. More particularly, the present invention relates to a novel maltose-trehalose converting enzyme which converts maltose into trehalose or converts trehalose into maltose, as well as to its preparation. The present invention further relates to a microorganism capable of producing the enzyme, a trehalose prepared with the enzyme, a saccharide composition containing the trehalose, and a composition containing the trehalose or the saccharide composition.

[Prior Art]

Trehalose or α , α -trehalose has been known as a non-reducing saccharide consisting of glucoses. As is described in *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol.18, pp.201-225 (1963), published by Academic Press, USA, and *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.56, pp.3,213-3,215 (1990), trehalose widely exists in microorganisms, mushrooms, insects, etc., though the content is relatively low. Trehalose is a non-reducing saccharide, so that it neither reacts with substances containing amino groups such as amino acids and proteins, induces the amino-carbonyl reaction, nor deteriorates amino acid-containing substances. Thus, trehalose can be used without a fear of causing an unsatisfactory browning and deterioration. Because of these, the establishment of an industrial-scale preparation of trehalose has been in great demand.

Conventional preparations of trehalose are, for

example, those disclosed in Japanese Patent Laid-Open No.154,485/75 wherein microorganisms are utilized, and in Japanese Patent Laid-Open No.216,695/83 wherein maltose is converted into trehalose by the combination use of maltose- and trehalose-phosphorylases. The former, however, is not suitable for the industrial-scale preparation because the content of trehalose present in microorganisms as a starting material is usually lower than 15 w/w % (the wording "w/w %" is abbreviated as "%" in the specification, unless otherwise specified), on a dry solid basis (d.s.b.), and the extraction and purification steps are complicated. The latter has the following demerits: (i) Since trehalose is formed via glucose-1-phosphate, the concentration of maltose as a substrate could not be set to a satisfactorily high-level; (ii) the enzymatic reaction systems of the phosphorylases are reversible reactions, and their yields of the objective trehalose are relatively low; and (iii) it is substantially difficult to retain their reaction systems stably and to proceed their enzymatic reactions smoothly. Therefore, the aforesaid conventional preparations could not be used as an industrial-scale preparation.

It is known that partial starch hydrolysates, prepared from a material starch such as liquefied starch, dextrans and maltooligosaccharides, have a reducing end group which exhibits a reducing power. The reducing power of reducing partial starch hydrolysates is generally expressed by "Dextrose Equivalent (DE) value" based on the dry weight. It is known that among reducing partial starch hydrolysates those with a relatively-high DE value generally have a considerably-low molecular weight and viscosity, as well as a relatively-high level of sweetness and reactivity, and readily react with

substances having amino groups such as amino acids and proteins to cause an unsatisfactory browning, smell and deterioration of their quality. Since the properties of reducing partial starch hydrolysates are varied dependently on their DE values, the relationship between reducing partial starch hydrolysates and their DE values is significant. It has been even believed impossible to break away the relationship in this field.

As regards the preparation of trehalose, it is reported in the column titled "*Oligosaccharides*" in the chapter of "*Current Status of Starch Application Development and Related Problems*" in "*Food Chemicals*", No.88, pp.67-72 (August, 1992) that "*In spite of a wide applicability of trehalose, the enzymatic preparation via a direct saccharide-transfer reaction or a hydrolytic reaction has been reported to be scientifically almost impossible in this field.*" Thus, the preparation of trehalose by an enzymatic reaction using starch as a material has been deemed scientifically very difficult.

The present inventors, however, had changed this common sense and succeeded to establish a preparation of trehalose as disclosed in Japanese Patent Application No.362,131/92 wherein trehalose is directly produced from non-reducing partial starch hydrolysates by allowing glucoamylase together with a non-reducing saccharide-forming enzyme capable of forming non-reducing saccharides, having a trehalose structure as an end unit and having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, to act on reducing partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 3 or higher, prepared from a material starch. The method, however, requires 2 or more types of enzymes and employs as a

material a relatively-high molecular weight amylaceous saccharide having a degree of glucose polymerization of 3 or higher as well as a relatively-high viscosity. In addition, the saccharide composition of the resultant product is considerably complicated, and this may result in a high production cost. Therefore, the establishment of a novel preparation of trehalose in which trehalose is formed from maltose and partial starch hydrolysates having a degree of glucose polymerization of 2, both of which are industrially produced, stably supplied and commercially available.

[Object of the Invention]

The object of the present invention is to provide a maltose-trehalose converting enzyme which converts an industrially producible and stably suppleable maltose into trehalose and to provide a novel preparation and uses of trehalose and a saccharide composition containing the trehalose prepared with the enzyme.

[Means to Attain the Object]

In order to attain the object, the present inventors have extensively screened microorganisms capable of producing a novel saccharide-converting enzyme which forms trehalose from maltose. As a result, we found that a microorganism of the genus *Pimelobacter*, i.e. *Pimelobacter* sp. R48, isolated from a soil in Okayama-city, Okayama, Japan; a microorganism of the genus *Pseudomonas*, i.e. *Pseudomonas putida* H262, isolated from a soil in Nishinomiya-city, Hyogo, Japan; and a microorganism of the genus *Thermus* form a novel maltose-trehalose converting enzyme which converts maltose into trehalose, and established a preparation of trehalose and a saccharide composition

containing the trehalose, as well as compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals containing the trehalose or the saccharide composition. Thus, we accomplished this invention.

The identification test of a microorganism of the genus *Pimelobacter*, i.e. "*Pimelobacter* sp. R48", and a microorganism of the genus *Pseudomonas*, i.e. *Pseudomonas putida* H262, according to the present invention gave the following results. The test was conducted in accordance with the method as described in "*Biseibutsu-no-Bunrui-to-Dotei*" (Classification and Identification of Microorganisms), edited by Takeji Hasegawa, published by Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan (1985).

The results of *Pimelobacter* sp. R48 were as follows:

A. Morphology

(1) Characteristics of cells when incubated at 27°C in nutrient agar

Usually existing in a rod form of 0.5-0.9x1.5-4.0µm;

Existing single but uncommonly existing in a V-form pair or in a linked form;

Possessing no motility and being asporogenic;

Non acid-fast; and

Gram stain : Positive.

(2) Characteristics of cells when incubated at 27°C in agar medium supplemented with yeast- and malto-extracts

Having a size of 0.6-1.0x1.3-4.2µm after one-day culture and existing in the form of a

nearly cocci with a size of 0.6-1.0x1.0-2.5 μ m
after 3-day culture;

Exhibiting polymorphism; and

Existing single but uncommonly existing in a V-form pair or in a linked form.

B. Cultural property

(1) Characteristics of colony formed when incubated at 27°C in nutrient agar plate
Shape : Circular colony having a diameter of 0.5 mm after 24-hours incubation and 1.5-2 mm after 3-days incubation;

Rim : Auriculate-like;

Projection : Hemispherical shape;

Gloss : None;

Surface : Rugose-like;

Color : Creamy and opaque colony;

(2) Characteristics of colony formed when incubated at 27°C in agar plate supplemented with yeast- and malto-extracts

Shape : Circular colony having a diameter of about 1-1.5 mm after 3-days incubation;

Rim : Auriculate-like;

Projection : Hemispherical shape;

Gloss : None;

Surface : Rugose-like;

Color : Creamy and opaque colony;

(3) Characteristics of colony formed when

incubated at 27°C in slant nutrient agar

Growth : Satisfactory;

Shape : Thread-like; and

(4) Not liquefying gelatin when stab-cultured
at 27°C in nutrient gelatin.

C. Physiological properties

(1) Reduction of nitrate : Positive;
(2) Denitrification reaction : Negative;
(3) Methyl red test : Negative;
(4) VP-test : Negative;
(5) Formation of indole : Negative;
(6) Formation of hydrogen sulfide : Positive;
(7) Hydrolysis of starch : Negative;
(8) Utilization of citric acid : Positive;
(9) Utilization of inorganic nitrogen source:
Utilizing ammonium salts and nitrates;
(10) Formation of pigment : Negative;
(11) Urease : Negative;
(12) Oxidase : Negative;
(13) Catalase : Negative;
(14) Growth conditions : Growing at a pH in the
range of 5-9 and a temperature in the
range of 15-40°C;
(15) Oxygen requirements : Aerobic;
(16) Utilization of carbon source and acid
formation

Carbon source	Utilization	Acid formation
D-Glucose	+	-
D-Galactose	-	-

D-Fructose	+	-
------------	---	---

(Continued)

Carbon source	Utilization	Acid formation
D-Mannose	+	-
L-Arabinose	+	-
D-Xylose	+	-
L-Rhamnose	+	-
Maltose	+	-
Sucrose	+	-
Lactose	-	-
Trehalose	+	-
Raffinose	+	-
Mannitol	-	-
Dextrin	+	-
Dulcitol	-	-

(17) Decarboxylase test on amino acid

Negative against L-lysine, L-arginine and
L-ornithine;

(18) Utilization of amino acid

Utilizing sodium L-glutamate and sodium L-
asparate;

(19) DNase : Negative;

(20) Formation of 3-ketolactose : Negative;

(21) Mol% guanine (G) plus cytosine (C) of DNA
: 72%; and

(22) Main diamino acid of cell wall

LL-Diaminopimelic acid.

The results of *Pseudomonas putida* H262 were as follows:

A. Morphology

(1) Characteristics of cells when incubated at 27°C in nutrient agar

Usually existing in a rod form of 0.5-0.7x1.0-2.0 μm and possessing asporogenicity; Possessing motility by flagellum; Non acid-fast; and Gram stain : Negative.

(2) Characteristics of cells when incubated at 27°C in agar medium supplemented with yeast- and malto-extracts

Having a size of 0.6-0.8x2.0-4.0 μm after one-day culture.

B. Cultural property

(1) Characteristics of colony formed when incubated at 27°C in nutrient agar plate

Shape : Circular colony having a diameter of 1-2 mm after 24-hours incubation and 3.5-4 mm after 3-days incubation;

Rim : Entire;

Projection : Hemispherical shape;

Gloss : Moist gloss;

Surface : Smooth;

Color : Creamy or white opaque colony;

(2) Characteristics of colony formed when

incubated at 27°C in agar plate
supplemented with yeast- and malto-
extracts

Shape : Circular colony having a
diameter of about 4-5 mm after
3-days incubation;

Rim : Entire;

Projection : Hemispherical shape;

Gloss : Moist gloss;

Surface : Smooth;

Color : Creamy or white opaque colony;

(3) Characteristics of colony formed when
incubated at 27°C in slant nutrient agar
Growth : Satisfactory;

Shape : Thread-like. Forming a
relatively-thin projection with
a smooth surface, moist gloss,
opaque and yellowish cream; and

(4) Not liquefying gelatin when stab-cultured
at 27°C in nutrient gelatin.

C. Physiological properties

(1) Reduction of nitrate in a succinic acid
medium : Positive;

(2) Denitrification reaction : Negative;

(3) Methyl red test : Negative;

(4) VP-test : Negative;

(5) Formation of indole : Negative;

(6) Formation of hydrogen sulfide :

Negative;

- (7) Hydrolysis of starch : Negative;
- (8) Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate:
Negative
- (9) Decomposition of procatechuate: Ortho-type
- (10) Utilization of citric acid : Positive;
- (11) Utilization of inorganic nitrogen source:
Utilizing ammonium salts and nitrates;
- (12) Formation of pigment : Pale yellowish pigment;
- (13) Formation of fluorescent pigment : Positive
- (14) Urease : Positive;
- (15) Oxidase : Positive;
- (16) Catalase : Positive;
- (17) Growth conditions : Growing at a pH in the range of 5-9 and a temperature in the range of 10-37°C;
- (18) Oxygen requirements : Aerobic;
- (19) Utilization of carbon source and acid formation

Carbon source	Utilization	Acid formation ability
D-Glucose	+	-
D-Galactose	-	-

D-Mannose	+	+
D-Fructose	+	+

(Continued)

Carbon source	Utilization	Acid formation ability
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+
L-Rhamnose	+	-
Maltose	+	-
Sucrose	+	-
Lactose	-	-
Trehalose	+	-
Raffinose	+	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Dulcitol	-	-
Glycerol	+	+

(20) Decarboxylase test on amino acid

Negative against L-lysine and L-ornithine
and positive against L-arginine;

(21) Utilization of amino acid

Utilizing sodium L-glutamate, sodium L-asparate, sodium L-arginine, L-histidine, L-valine and D-alanine, but not L-tryptophane;

(22) DNase : Negative;

(23) Formation of 3-ketolactose : Negative; and

(24) Mol% guanine (G) plus cytosine (C) of DNA

: 63%.

Based on the results, the bacteriological properties were compared with those of known microorganisms with reference to *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st edition (1984). As a result, it was revealed that the microorganism was identified as a microorganism of the species *Pseudomonas putida*.

The present inventors had named this microorganism "*Pseudomonas putida* H262", and deposited it on February 23, 1994, in National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan. The deposition of the microorganism was accepted on the same day and has been maintained by the institute under the accession number of FERM BP-4579.

In addition to the above-identified microorganism, other strains of the genus *Pseudomonas* and their mutants can be adequately used in the invention as long as they produce the present maltose-trehalose converting enzyme.

Furthermore, microorganisms of the genus *Thermus*, for example, those of the species *Thermus aquaticus* (ATCC 25104), *Thermus aquaticus* (ATCC 33923), *Thermus filiformis* (ATCC 43280), *Thermus ruber* (ATCC 35948), *Thermus sp.* (ATCC 43814), and *Thermus sp.* (ATCC 43815) can be suitably used in the invention.

Any nutrient culture medium can be used in the invention as long as the microorganisms can grow therein and produce the present enzyme: For example, synthetic- and

natural-nutrient culture media can be arbitrarily used. Any carbon-containing substance can be used in the invention as a carbon source as long as it is utilized by the microorganisms: Examples of such a carbon source are saccharides such as glucose, fructose, molasses, trehalose, lactose, sucrose, mannitol, sorbitol, partial starch hydrolysates; and organic acids such as citric acid and succinic acid as well as their salts. The concentrations of these carbon sources in nutrient culture media are appropriately chosen. For example, in the case of using glucose, a preferable concentration is usually 40 w/v % or lower, preferably, 10 w/v % or lower, d.s.b., in view of the growth and proliferation of the microorganisms. The nitrogen sources usable in the invention are, for example, inorganic nitrogen compounds such as ammonium salts and nitrates; and organic nitrogen-containing compounds such as urea, corn steep liquor, casein, peptone, yeast extract and meat extract. The inorganic ingredients usable in the invention are, for example, calcium salts, magnesium salts, potassium salts, sodium salts, phosphates and other salts of manganese, zinc, iron, copper, molybdenum and cobalt.

The cultural conditions used in the invention are those in which the microorganisms can grow and produce the present enzyme, for example, aerobic conditions at a temperature in the range of about 4-80°C, preferably, a temperature in the range of about 20-75°C; and at a pH in the range of about 5-9, preferably, a pH in the range of 6-8.5. The cultivation time suitably used in the invention is set to a time longer than that required for the growth initiation of

the microorganisms, preferably, 10-100 hours. The concentration of dissolved oxygen (DO) in nutrient culture media is not specifically restricted, and, usually a DO in the range of about 0.5-20 ppm is satisfactory. The DO level can be kept within the range by controlling the aeration rate, stirring nutrient culture media, supplementing oxygen to aeration, and increasing the inner pressure of fermenters. The culture can be carried out batchwise or in continuous manner.

After completion of the culture, the present enzyme is recovered therefrom. Inasmuch as the activity of the present enzyme is found in both cells and cell-free supernatants, they can be recovered and used as a crude enzyme. The resultant culture can be used intact as a crude enzyme. Conventional liquid-solid separation methods can be employed in the invention to remove cells from the culture. For example, methods to directly centrifuge the resultant culture and those to filtrate cells with precoat filters or to filtrate cells by the addition of filter aids, as well as to separate cells by membrane filtration using plate filters or hollow fibers, can be suitably used. Cell-free filtrates thus obtained can be used intact as an enzyme solution or may be concentrated in usual manner prior to their use. The concentration methods usable in the invention are, for example, salting out using ammonium sulfate, sedimentation using acetone and alcohol, and membrane filtration using plate filters, hollow fibers, etc.

In case of the present enzyme is an intracellular enzyme, it can be extracted from cells by conventional

techniques, and the resultant extract can be used as a crude enzyme. In order to obtain such an extract, cells are disrupted by an ultrasonic disruption, mechanical disruption using glass beads or alumina, french-press disruption, etc., followed by subjecting the resultant to centrifugation or membrane filtration to obtain a clear crude-enzyme-solution.

Cell-free filtrates and their concentrates as well as cell extracts can be immobilized by conventional techniques. Examples of such an immobilization technique are conjugation methods using ion-exchangers, covalent linkages and absorptions using resins and membranes, and inclusion methods using high-molecular weight substances. Intact cells separated from the resultant culture can be used as a crude enzyme or may be immobilized prior to their use. For example, the cells are immobilized by mixing them with sodium alginate, and dropping the suspension in calcium chloride solution to gelatinize the drops into granules. The resultant granules can be fixed by polyethylene imine or glutaraldehyde prior to their use.

The crude enzyme solutions thus obtained can be used intact or purified by conventional methods prior to their use. For example, a purified enzyme preparation, which exhibits an electrophoretically single band, can be prepared by dialyzing a crude enzyme preparation, which had been prepared by salting out an extract from disrupted cells with ammonium sulfate and concentrating the resultant, and successively purifying the dialyzed solution on anion-exchange column chromatography using "DEAE-TOYOPEARL®", an anion exchanger; hydrophobic column chromatography using "BUTYL-TOYOPEARL®", a hydrophobic resin,

all of which are products of Tosoh Corporation, Tokyo, Japan; anion-exchange column chromatography using "MONO Q HR5/5", an anion exchanger commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden; and gel filtration column chromatography using "TOYOPEARL[®] HW-55", a resin commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan. These procedures provide an enzyme which shows an electrophoretically single band.

The present maltose-trehalose converting enzyme thus obtained has the following physicochemical properties:

(1) Action

Converting maltose into trehalose and vice versa.

(2) Molecular weight

About 57,000-120,000 daltons on sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(3) Isoelectric point (pI)

About 3.8-5.1 on isoelectrophoresis using ampholyte;

(4) Inhibition of activity

Being inhibited by one mM Cu⁺⁺, Hg⁺⁺ and Tris-HCl buffer; and

(5) Origin

Originated from microorganisms.

More particularly, the physicochemical property of the present enzyme differs dependently on its origin as shown in the below.

A maltose-trehalose converting enzyme derived from

Pimelobacter sp. R48 has the following physicochemical properties:

(1) Action

Converting maltose into trehalose and vice versa.

Forming about one mole of trehalose from one mole of maltose or forming about one mole of maltose from one mole of trehalose;

(2) Molecular weight

About 57,000-67,000 daltons on sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE);

(3) Isoelectric point (pI)

About 4.1-5.1 on isoelectrophoresis using ampholyte;

(4) Inhibition of activity

Being inhibited by one mM Cu⁺⁺, Hg⁺⁺ and Tris-HCl buffer; and

(5) Optimum temperature

About 20°C when incubated at pH 7.0 for 60 min;

(6) Optimum pH

About 7.0-8.0 when incubated at 25°C for 60 min;

(7) Thermal stability

Being stable up to about 30°C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(8) pH Stability

Being stable at a pH of about 6.0-9.0 when incubated at 20°C for 60 min.

A maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pseudomonas putida* H262 has the following physicochemical properties:

(1) Action

Converting maltose into trehalose and vice versa;

Forming about one mole of trehalose from one mole of maltose or forming about one mole of maltose from one mole of trehalose;

(2) Molecular weight

About 110,000-120,000 daltons on SDS-PAGE;

(3) Isoelectric point (pI)

About 4.1-5.1 on electrophoresis using ampholyte;

(4) Inhibition of activity

Being inhibited by one mM Cu⁺⁺, Hg⁺⁺ and 50 mM Tris-HCl buffer;

(5) Optimum temperature

About 37°C when incubated at pH 7.0 for 60 min;

(6) Optimum pH

Being stable at a pH of about 7.3-8.3 when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(7) Thermal stability

Being stable up to 40° C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(8) pH Stability

Being stable at a pH of about 6.0-9.5 when incubated at 35° C for 60 min.

The maltose-trehalose converting enzyme derived from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) has the following physicochemical properties:

(1) Action

Converting maltose into trehalose and vice versa;

Forming about one mole of trehalose from one mole of maltose or forming about one mole of maltose from one mole of trehalose;

(2) Molecular weight

About 100,000-110,000 daltons on SDS-PAGE;

(3) Isoelectric point (pI)

About 3.8-4.8 on electrophoresis using ampholyte;

(4) Inhibition of activity

Being inhibited by one mM Cu⁺⁺, Hg⁺⁺ and 50 mM Tris-HCl buffer;

(5) Optimum temperature

About 65° C when incubated at pH 7.0 for 60 min;

(6) Optimum pH

Being stable at a pH of about 6.0-6.7 when

incubated at 60°C for 60 min;

(7) Thermal stability

Being stable up to a temperature of 80°C when incubated at pH 7.0 for 60 min; and

(8) pH Stability

Being stable at a pH of about 5.5-9.5 when incubated at 60°C for 60 min.

The activity of the present maltose-trehalose converting enzyme is assayed as follows: One ml of an enzyme solution is added to one ml of 20 w/v % maltose as a substrate in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), and the mixture solution is incubated at 25°C, 35°C or 60°C for 60 min, followed by the heating the solution at 100°C for 10 min to suspend the enzymatic reaction. To the resultant reaction mixture is precisely diluted by 11-fold with 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), and 0.4 ml of the diluted solution is admixed with 0.1 ml of a trehalase solution having one unit/ml of trehalase. The resultant solution is incubated at 45°C for 120 min, followed by determining the amount of glucose by the glucose-oxidase method. As a control, by using trehalase and an enzyme solution, which were preheated at 100°C for 10 min to inactivate the enzyme, the activity of the enzyme solution is assayed similarly as above. With the above assay, the content of trehalose, formed by the present maltose-trehalose converting enzyme, is determined based on the amount of glucose formed, and one unit activity of the enzyme is defined as the amount of enzyme which forms one μmole of trehalose per minute. As regards to the reaction temperature, it is set to 25°C for

the enzyme of a microorganism of the genus *Pimelobacter*; 35°C for that of the genus *Pseudomonas*; and 60°C for that of the genus *Thermus*.

Since the present maltose-trehalose converting enzyme converts maltose into trehalose and vice versa, maltose or trehalose as a substrate can be used to meet to its final use. Maltose is used as a substrate for preparing trehalose.

Any maltose can be used in the invention as long as it is converted into trehalose when received with the action of the present maltose-trehalose converting enzyme, and, in general, high maltose content products with the highest possible purity, preferably, those with a purity of 70% or higher, d.s.b., can be suitably used. Commercially available maltose products and those prepared by conventional starch saccharification techniques are also used.

Examples of maltose preparation from starch are those disclosed in Japanese Patent Publication Nos.11,437/81 and 17,078/81 wherein β -amylase is allowed to act on gelatinized-and liquefied-starch to form maltose which is then separated from high molecular weight dextrin and recovered in a high maltose content product. Other examples are those disclosed in Japanese Patent Publication Nos.13,089/72 and 3,938/79 wherein β -amylase is allowed to act on gelatinized- and liquefied-starch together with a starch debranching enzyme such as isoamylase and pullulanase to form maltose which is then recovered in a high maltose content product.

To the concomitant saccharides such as maltotriose present in the resultant high maltose content products,

prepared by the aforesaid preparations, are added the enzymes as disclosed in Japanese Patent Publication Nos.28,153/81, 3,356/82 and 28,154/81 to increase the maltose content. The maltose content in the high maltose content products can be satisfactorily more increased by removing the concomitant saccharides on column chromatography using a strong-acid cation-exchange resin as disclosed in Japanese Patent Laid-Open No.23,799/83.

The concentration of the substrates used in the invention is not specifically restricted. The enzymatic reaction of the present enzyme proceeds even in a solution of 0.1% or 50% of a material maltose, resulting in the formation of trehalose. Suspensions containing insoluble substrates can be used in the invention. The temperature used in the present enzymatic reaction can be set to a temperature at which the enzyme is not inactivated, i.e. a temperature up to about 80°C, preferably, a temperature in the range of about 0-70°C. The reaction pH used in the present enzymatic reaction is set to a pH in the range of about 5.5-9.0, preferably, a pH in the range of about 6.0-8.5. The reaction time used in the present enzymatic reaction is adequately chosen dependently on the reaction conditions, and, usually, it is in the range of about 0.1-100 hours when the enzyme is used in an amount of about 0.1-100 units/g substrate, d.s.b.

The present enzymatic reaction enables the conversion of trehalose from a material maltose in a relatively-high conversion rate, i.e. the maximum is about 70-85%.

The reaction mixture thus obtained are in usual

manner subjected to filtration and centrifugation to remove insoluble substances, and decolored with an activated charcoal, desalted with ion-exchangers in H- and OH-form, and concentrated into syrupy products. If necessary, the syrupy products can be arbitrarily dried into powdery products or prepared into crystalline products.

Furthermore, the powdery products are readily processed into high-purity trehalose products by purifying them with one or more methods, for example, fractionations by ion-exchange column chromatography and column chromatography using an activated charcoal or a silica gel; and alkaline treatments to decompose and remove the remaining reducing saccharides. Maltose separable by such a column chromatography can be suitably used as a substrate for the conversion of maltose into trehalose by the present maltose-trehalose converting enzyme.

If necessary, the present saccharide composition containing trehalose can be hydrolyzed by glucoamylase and α -glucosidase, or subjected to a saccharide-transfer reaction by using cyclomaltodextrin glucanotransferase and/or glucosyltransferase to control its sweetness, reducing power and viscosity. Furthermore, reducing saccharides in the resultant trehalose products can be arbitrarily removed by decomposing them with alkaline treatments and fermenting them with yeasts, or hydrogenated into sugar alcohols. Thus, their reducing power is eliminated. From the resultants, glucose can be removed by the above purification methods such as ion-exchange column chromatography to obtain high trehalose content fractions. The fractions thus obtained can be readily purified

and concentrated into syrupy products, and, if necessary, the syrupy products can be further concentrated into supersaturated solutions and crystallized into hydrous or anhydrous crystalline trehalose.

The ion-exchange column chromatography usable in the invention includes, for example, those which employ a strong-acid cation-exchange resin as disclosed in Japanese Patent Laid-Open Nos.23,799/83 and 72,598/83. By using the column chromatography, the concomitant saccharides contained in a crude trehalose product can be readily removed to obtain high trehalose content fractions. In this case, any one of fixed-bed, moving bed and semi-moving methods can be arbitrarily employed.

In order to prepare hydrous crystalline trehalose, a 65-90% solution of trehalose with a purity of 60% or higher is placed in a crystallizer, and gradually cooled while stirring in the presence or absence of an about 0.1-20% seed crystal at a temperature of 95°C or lower, preferably, at a temperature in the range of 10-90°C, to obtain a massecuite containing hydrous crystalline trehalose. Continuous crystallization methods, which attain the crystallization of the objective saccharides under their concentration *in vacuo*, can be arbitrarily employed. Conventional methods such as separation, block pulverization, fluidized-bed granulation and spray drying can be employed in the invention to prepare from the massecuite hydrous crystalline trehalose or crystalline saccharides containing it.

In the case of separation, massecuites are usually

subjected to a basket-type centrifuge to separate hydrous crystalline trehalose from a mother liquor, and, if necessary, the resultant hydrous crystalline trehalose is washed by spraying it with a small amount of cold water to facilitate the preparation of hydrous crystalline trehalose with an increased purity.

In the case of spray drying, crystalline saccharides with no or substantially free of hygroscopicity are readily prepared by spraying massecuites having a concentration of about 60-85%, d.s.b., and a crystallinity of about 20-60%, d.s.b., from a nozzle by a high-pressure pump; drying the resultants with an about 60-100°C hot air which does not melt the resultant crystalline powders; and aging the resultant powders for about 1-20 hours while blowing with an about 30-60°C hot air.

In the case of block pulverization, crystalline saccharides with no or substantially free of hygroscopicity are readily prepared by allowing massecuites having a moisture content of about 10-25% and a crystallinity of about 10-60%, d.s.b., to stand for several hours to 3 days or so in order to crystallize and solidify the whole contents into blocks, pulverizing or cutting the resultant blocks, and drying the resultants.

Although anhydrous crystalline trehalose can be prepared by drying hydrous crystalline trehalose to convert it into anhydrous form, it is generally prepared by providing a high trehalose content solution with a moisture content less than 10%, placing the solution in a crystallizer, keeping the

solution in the presence of a seed crystal at a temperature in the range of 50-160°C, preferably, at a temperature in the range of 80-140°C under stirring conditions to obtain a massecuite containing anhydrous crystalline trehalose, and crystallizing and pulverizing the anhydrous crystalline trehalose by conventional methods such as block pulverization, fluidized-bed granulation and spray drying under the conditions of dry and relatively-high temperature.

The present trehalose thus obtained is stable and substantially free of reducing power, and can be mixed and processed with other materials, specifically, amino acids and amino acid-containing substances such as oligopeptides and proteins without a fear of causing unsatisfactory browning and smell as well as deterioration of the materials. Trehalose per se has a satisfactorily-high quality and sweetness. Since trehalose is readily hydrolyzed by trehalase into glucoses, it is readily assimilated, absorbed and utilized by living bodies as an energy source when orally administered. Furthermore, trehalose is not substantially fermented by dental caries-inducing microorganisms, and this renders it useful as a sweetener which does not substantially induce dental caries.

The present trehalose is a stable sweetener, and, specifically, crystalline trehalose is arbitrarily used as a sugar coating agent for tablets when used in combination with a binder such as pullulan, hydroxyethyl starch or polyvinylpyrrolidone. In addition, the trehalose has properties such as osmotic pressure-controlling ability, filler-imparting ability, gloss-imparting ability, moisture-

retaining ability, viscosity-imparting ability, substantial non-fermentability, ability to prevent retrogradation of gelatinized starch, and ability to prevent crystallization of other saccharides.

Thus, the present trehalose and saccharide composition containing the same can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer and filler in a variety of compositions such as food products, cigarettes, tobaccos, feeds, cosmetics and pharmaceuticals.

The present trehalose and saccharide composition can be used intact as a seasoning for sweetening. If necessary, they can be used in combination with adequate amounts of one or more other sweeteners, for example, powdered syrup, glucose, maltose, sucrose, isomerized sugar, honey, maple sugar, sorbitol, maltitol, lactitol, dihydrocharcone, stevioside, α -glycosyl stevioside, rebaudioside, glycyrrhizin, L-aspartyl L-phenylalanine methyl ester, saccharin, glycine and alanine; and/or a filler such as dextrin, starch and lactose.

Powdery or crystalline products containing the present trehalose or the saccharide composition can be used intact, and, if necessary, they can be mixed with an excipient, filler, diluent and binder, and formed into granules, spheres, shot-rods, plates, cubes and tablets, prior to their use.

The present saccharide composition containing trehalose with a low reducing-power and trehalose separated therefrom well harmonize with other materials having sour-, acid-, salty-, bitter-, astringent- and delicious-tastes, and

have a relatively-high acid tolerance and heat resistance. Thus, they can be favorably used in food products in general as a sweetener, taste-improving agent and quality-improving agent.

The present trehalose and saccharide composition containing the same can be used in seasonings such as a soy sauce, powdered soy sauce, "miso", "funmatsu-miso" (a powdered miso), "moromi" (a refined sake), "hishio" (a refined soy sauce), "furikake" (a seasoned fish meal), mayonnaise, dressing, vinegar, "sanbai-zu" (a sauce of sugar, soy sauce and vinegar), "funmatsu-sushi-su" (powdered vinegar for sushi), "chuka-no-moto" (an instant mix for Chinese dish), "tentsuyu" (a sauce for Japanese deep-fat fried food), "mentsuyu" (a sauce for Japanese vermicelli), sauce, catsup, "takuan-zuke-no-moto" (a premix for pickled radish), "hakusai-zuke-no-moto" (a premix for fresh white rape pickles), "yakiniku-no-tare" (a sauce for Japanese grilled meat), curry roux, instant stew mix, instant soup mix, "dashi-no-moto" (an instant stock mix), mixed seasoning, "mirin" (a sweet sake), "shin-mirin" (a synthetic mirin), table sugar and coffee sugar.

The present trehalose and saccharide composition containing the same can be also used freely for sweetening "wagashi" (Japanese cakes) such as "senbei" (a rice cracker), "arare-mochi" (a rice-cake cube), "okoshi" (a millet-and-rice cake), "mochi" (a rice paste), "manju" (a bun with a bean-jam), "uiro" (a sweet rice jelly), "an" (a bean jam), "yokan" (a sweet jelly of beans), "mizu-yokan" (a soft adzuki-bean jelly),

"kingyoku" (a kind of yokan), jelly, pao de Castella and "amedama" (a Japanese toffee); confectioneries such as bun, biscuit, cracker, cookie, pie, pudding, butter cream, custard cream, cream puff, waffle, sponge cake, doughnut, chocolate, chewing gum, caramel and candy; frozen desserts such as ice cream and sherbet; syrups such as "kajitsu-no-syrup-zuke" (a preserved fruit) and "korimitsu" (a sugar syrup for shaved ice); pastes such as flour paste, peanut paste, fruit paste and spread; processed fruits and vegetables such as jam, marmalade, "syrup-zuke" (fruit pickles) and "toka" (conserves); pickles and pickled products such as "fukujin-zuke" (red colored radish pickles), "bettara-zuke" (a kind of whole fresh radish pickles), "senmai-zuke" (a kind of sliced fresh radish pickles) and "rakkyo-zuke" (pickled shallots); meat products such as ham and sausage; products of fish meat such as fish ham, fish sausage, "kamaboko" (a steamed fish paste), "chikuwa" (a kind of fish paste) and "tenpura" (a Japanese deep-fat fried fish paste); "chinmi" (relish) such as "uni-no-shiokara" (salted guts of sea urchin), "ika-no-shiokara" (salted guts of squid), "su-konbu" (processed tangle), "saki-surume" (dried squid strips) and "fugu-no-mirin-boshi" (a dried mirin-seasoned swellfish); "tsukudani" (foods boiled down in soy sauce) such as those of laver, edible wild plants, dried squid, fish and shellfish; daily dishes such as "nimame" (cooked beans), potato salad and "konbu-maki" (a tangle roll); milk products such as milk beverage, yogurt and cheese; canned and bottled products such as those of meat, fish meat, fruit and vegetable;

alcoholic beverages such as synthetic sake, wine and liquors; soft drinks such as coffee, tea, cocoa, juice, carbonated beverage, sour milk beverage and beverage containing a lactic acid bacterium; instant food products such as instant pudding mix, instant hot cake mix and "sokuseki-shiruco" (an instant mix of adzuki-bean soup with rice cake) and instant soup mix; and beverages such as baby foods, foods for therapy, and beverages supplemented with nutrition; as well as for improving the tastes and qualities of the aforementioned food-products.

The present trehalose and saccharide composition containing the same can be also used in feeds and pet foods for animals such as domestic animals, poultry, honey bees, silk worms and fishes in order to improve their taste preferences. The present trehalose and saccharide composition can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent and stabilizer in other products in paste and liquid form such as a tobacco, cigarette, dentifrice, lipstick, rouge, lip cream, internal medicine, tablet, troche, cod liver oil in the form of a drop, cachou, oral refrigerant, gargle, cosmetic and pharmaceutical.

The present trehalose and saccharide composition containing the same can be used as a quality-improving agent and stabilizer for biologically active substances susceptible to loss of their effective ingredients and activities, as well as in health foods and pharmaceutical compositions containing biologically active substances. Examples of such a biologically active substance are lymphokines such as α -, β - and γ -interferons, tumor necrosis factor- α (TNF- α), tumor

necrosis factor- β (TNF- β), macrophage migration inhibitory factor, colony-stimulating factor, transfer factor and interleukin 2 (IL-2); hormones such as insulin, growth hormone, prolactin, erythropoietin, follicle-stimulating hormone, and placental hormone; biological preparations such as BCG vaccine, Japanese encephalitis vaccine, measles vaccine, live polio vaccine, smallpox vaccine, tetanus toxoid, Trimeresurus antitoxin and human immunoglobulin; antibiotics such as penicillin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin and kanamycin sulfate; vitamins such as thiamine, riboflavin, L-ascorbic acid, cod liver oil, carotenoid, ergosterol and tocopherol; enzymes such as lipase, elastase, urokinase, protease, β -amylase, isoamylase, glucanase and lactase; extracts such as ginseng extract, snapping turtle extract, chlorella extract, aloe extract and propolis extract; viable microorganisms such as viruses, lactic acid bacteria and yeasts; and other biologically active substances such as royal jelly. By using the present trehalose and saccharide composition containing the same, the aforementioned biologically active substances are readily prepared into health foods and pharmaceutical compositions with a satisfactorily-high stability and quality without a fear of losing or inactivating their activities and effective ingredients.

As described above, the methods to incorporate the present trehalose and saccharide composition containing the same into the aforementioned substances and compositions include conventional methods, for example, mixing, kneading, dissolving, melting, soaking, permeating, sprinkling, applying,

coating, spraying, injecting, crystallizing and solidifying. The trehalose and saccharide composition are usually incorporated into the aforementioned substances and compositions in an amount of 0.1% or higher, preferably, one % or higher, d.s.b.

The following experiments explain the present invention more in detail:

Experiment 1

Production of enzyme

One hundred ml aliquots of a liquid nutrient culture medium, consisting of 2.0 w/v % glucose, 0.5 w/v % polypeptone, 0.1 w/v % yeast extract, 0.06 w/v % disodium hydrogenphosphate, 0.1 w/v % potassium hydrogenphosphate, 0.05 w/v % magnesium sulfate heptahydrate, 0.5 w/v % calcium carbonate and water, were placed in 500-ml Erlenmeyer flasks, autoclaved at 115°C for 30 min to effect sterilization, cooled, and inoculated with a seed culture of *Pimelobacter* sp. R48 (FERM BP-4315), followed by a cultivation at 27°C for 24 hours under stirring conditions of 200 rpm. The resultant cultures were pooled and used as a seed culture.

About 20 L aliquot of a fresh preparation of the same liquid nutrient culture medium as used in the above culture was placed in a 30-L fermenter, sterilized, cooled to 27°C, and inoculated with one v/v % of the seed culture, followed by the culture at 27°C and a pH of 6.0-8.0 for about 40 hours under stirring and aerobic conditions.

The activity of a maltose-trehalose converting enzyme, accumulated in the resultant culture, was 0.55

units/ml. A portion of the culture was separated by centrifugation into cells and a supernatant, and the cells were suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) to give the same volume of that of the portion, followed by assaying the enzyme activity in the cell suspension and the supernatant to give 0.5 units/ml and 0.05 units/ml respectively. The enzyme activity was the value assayed at 25°C.

Experiment 2

Purification of enzyme

The culture obtained in Experiment 1 was centrifuged to obtain an about 0.5 kg wet cells which were then suspended in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). The resultant cell suspension was subjected to "VIBROGEN-ZELLMÜHLE", a cell disrupting apparatus commercialized by Edmund Bühler, Tübingen, Germany, and the resultant mixture was centrifuged at 15,000xg for 30 min to obtain an about 4.5 L supernatant. Ammonium sulfate was added to the supernatant and dissolved therein to give a saturation degree of 0.3, and the solution was allowed to stand at 4°C for 4 hours, and centrifuged to obtain a supernatant.

Ammonium sulfate was added to the resultant supernatant and dissolved therein to give a saturation degree of 0.8, and the solution was allowed to stand at 4°C overnight, and centrifuged to obtain a sediment.

The sediment was dissolved in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), dialyzed against a fresh preparation of the same buffer for 24 hours, and centrifuged to remove insoluble substances. Four hundred ml of the resultant dialyzed solution

was divided into 2 portions which were then separately subjected to column chromatography using a column packed with 300 ml of "DEAE-TOYOPEARL® GEL", an ion-exchanger commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan.

The present maltose-trehalose converting enzyme adsorbed on the ion-exchanger was eluted from the column with a fresh preparation of the same buffer supplemented with salt. Fractions with the enzyme activity eluted from the column were recovered and dialyzed against a fresh preparation of the same buffer supplemented with one M ammonium sulfate. The dialyzed solution was centrifuged to remove insoluble substances, and subjected to hydrophobic column chromatography using a column packed with 300 ml of "BUTYL-TOYOPEARL® 650 GEL", a hydrophobic gel commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan. The maltose-trehalose converting enzyme adsorb on the gel was eluted from the column with a liner gradient buffer ranging from 1-0 M ammonium sulfate, followed by recovering fractions with the enzyme activity.

The fractions were pooled and subjected to ion-exchange column chromatography using a column packed with 10 ml of "MONO Q HR5/5", a gel commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, followed by recovering fractions with the enzyme activity. The total activity, specific activity and yield in each purification step are tabulated in Table 1.

Table 1

Purification step	Total enzyme* activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Supernatant after cell disruption	7,310	0.25	100
Dialyzed solution after salting out	2,730	0.31	37.3
Eluate from ion-exchange column	2,290	1.35	31.3
Eluate from hydrophobic column	1,160	10.8	15.9
Eluate from ion-exchange column	819	33.6	11.2

Note : The symbol "*" means the present maltose-trehalose converting enzyme.

The purified enzyme preparation obtained by the above purification steps was electrophoresed by using a 7.5% sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel to give a single protein band, and this meant that it was a considerably-high purity preparation.

Experiment 3

Property of enzyme

A portion of a purified maltose-trehalose converting enzyme preparation, obtained by the method in Experiment 2, was electrophoresed by using a 10% sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel. The molecular weight was determined to be about 57,000-67,000 daltons by comparing it with those of marker proteins, commercialized by Japan Bio-Rad Laboratories,

Tokyo, Japan, which had been simultaneously electrophoresed.

Another portion of the purified maltose-trehalose converting enzyme preparation was isoelectrophoresed by using a polyacrylamide gel containing 2 v/v % "AMPHOLINE", an ampholyte commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden. The resultant gel was sliced into pieces, followed by measuring their pHs to reveal the pI of the enzyme being about 4.1-5.1.

Effects of temperature and pH on the activity of the present enzyme were studied in accordance with the method used for assaying the enzyme activity. The results were respectively shown in FIG. 1 (effect of temperature) and FIG. 2 (effect of pH). The optimum temperature of the enzyme was about 20°C when incubated at pH 7.0 for 60 min and the optimum pH was about 7.0-8.0 when incubated at 25°C for 60 min. The thermal stability of the enzyme was determined by incubating it in 50 mM phosphate buffers (pH 7.0) in test tubes at different temperatures for 60 min, cooling the test tubes with cold water, and assaying the remaining enzyme activity in each buffer. The pH stability of the enzyme was determined by incubating it in 50 mM phosphate buffers having different pHs at 20°C for 60 min, adjusting the buffers to pH 7.0, and assaying the residual enzyme activity in each buffer. The results of the thermal- and pH-stabilities of the enzyme were respectively shown in FIG.s 3 and 4. The enzyme was stable up to a temperature of about 30°C and stable at a pH of about 6.0-9.0. One mM Cu⁺⁺ or Hg⁺⁺ and 50 mM Tris-HCl buffer were inhibitory to the present enzyme.

Experiment 4

Action on saccharides

A variety of saccharides were tested for determining whether they could be used as a substrate for the present enzyme. Glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose, soluble starch, amylose having an average polymerization degree of 18, trehalose, neotrehalose, gentiobiose, kojibiose, isomaltose, cellobiose, maltitol, sucrose, maltulose, turanose, paratinose, trehalulose or lactose was prepared into a solution. A solution containing glucose and the equal amount of α -glucose 1-phosphate or β -glucose 1-phosphate was prepared.

The resultant solutions were respectively mixed with 2 units/g substrate, d.s.b., of a maltose-trehalose converting enzyme obtained by the method in Experiment 2, adjusted their substrate concentrations to 5 w/v %, and subjected to an enzymatic reaction at 20°C and pH 7.0 for 24 hours. Pre- and post-reaction mixtures were subjected to thin layer chromatography (TLC) using "KIESELGEL 60 (20x20 cm)", an aluminum plate for TLC commercialized by Merck & Co., Inc., Rahway, USA, for determining the action of the present enzyme on the saccharides. The resultant products were developed once on the plates by using a developing solvent system of 1-butanol, pyridine and water (=6:4:1 by volume). The products on the plates were colored by spraying thereto a 20 v/v % sulfuric acid in methanol, and heating the plates at 110°C for 10 min. The results were as shown in Table 2.

Table 2

Substrate	Action of enzyme	Substrate	Action of enzyme
Glucose	-	Cellobiose	-
Maltose	++	Maltitol	-
Maltotriose	-	Sucrose	-
Maltotetraose	-	Maltulose	-
Maltopentaose	-	Turanose	-
Maltohexaose	-	Paratinose	-
Maltoheptaose	-	Trehalulose	-
Soluble starch	-	Lactose	-
Amylose (average polymerization degree of 18)	-	α -Glucose 1-phosphate plus glucose	-
Trehalose	+	β -Glucose 1-phosphate plus glucose	-
Neotrehalose	-		
Neotrehalose	-		
Gentiobiose	-		
Kojibiose	-		
Isomaltose	-		

Note : In the table, the symbol "-" means that no change was observed before and after the enzymatic reaction; the symbol "+", the size of the substrate spot was slightly reduced because of the formation of other products; and the symbol "++", the size of the substrate spot was considerably reduced because of the formation of other products.

As is evident from the results in Table 2, it was revealed that the enzyme according to the present invention only acts on maltose and trehalose among other saccharides, and, especially, does not act on both a system containing

glucose and α -glucose 1-phosphate or β -glucose 1-phosphate. This concluded that the present enzyme is a novel enzyme differing from conventional maltose- and trehalose-phosphorylases.

Experiment 5

Products from maltose and trehalose

To an aqueous maltose solution was added 2 units/g maltose as a substrate, d.s.b., of a maltose-trehalose converting enzyme obtained by the method in Experiment 2 to give a final substrate concentration of 5 w/v %, and the solution was subjected to an enzymatic reaction at 20°C and pH 7.0 for 24 hours. The saccharide composition of the resultant reaction mixture was analyzed on gas chromatography (hereinafter abbreviated as "GLC"). A portion of the reaction mixture was dried, dissolved in pyridine and trimethylsilylated, and the resultant product was used as a sample for analysis. The apparatus and conditions used in the GLC analysis were "CG-16A", a gas chromatograph commercialized by Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan; a stainless-steel column, 3 mm in diameter and 2 m in length, packed with 2% "SILICONE OV-17/CHROMOSORB W" commercialized by GL Sciences Inc., Tokyo, Japan; a flow rate of 40 ml/min of nitrogen gas as a carrier gas; and a ratio of increasing temperature in an oven, 7.5°C/min ranging from 160-320°C. The saccharide composition was analyzed on a hydrogen flame ionization detector. The results were as shown in Table 3.

Table 3

Saccharide in reaction mixture	GLC retention time (min)	Saccharide composition (%)
Glucose	3.87 and 4.70	4.9
Maltose	11.93 and 12.27	22.3
X	12.34*	72.8

Note : The value of the symbol "*" accords with that of trehalose.

As is evident from the results in Table 3, it was revealed that the product "X" formed in quantity, and the retention time accorded with that of a commercially available trehalose. In order to identify the product "X", the following confirmation test was conducted. A fresh preparation of the same aqueous maltose solution as used in the above was diluted with 20 mM acetate buffer (pH 4.5) to give a maltose concentration of 2 w/v %, and 0.5 ml of the diluted solution was mixed with 0.1 unit of a glucoamylase specimen commercialized by Seikagaku-Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan, followed by subjecting the mixture to an enzymatic reaction at 40°C for 20 hours.

Similarly, a fresh preparation of the same aqueous maltose solution as used in the above was diluted with 20 mM acetate buffer (pH 7.0) to give a maltose concentration of 2 w/v %, and 0.5 ml of the diluted solution was mixed with 0.5 units of trehalase, followed by subjecting the mixture to an enzymatic reaction at 40°C for 20 hours. The pre-reaction mixture containing maltose as a substrate and the post-reaction mixture treated with glucoamylase and trehalase were analyzed

on GLC, followed by analyzing the data to reveal that maltose was completely decomposed into glucoses by glucoamylase, and the product "X" remained intact.

Maltose remained intact after the treatment of trehalase, and the product "X" was completely decomposed into glucoses. In view of the reaction mechanisms of glucoamylase and trehalase, it was concluded that the present enzyme forms from maltose an oligosaccharide, i.e. trehalose.

Furthermore, the purified enzyme according to the present invention was allowed to act on trehalose as a substrate under the same conditions as used in the case of maltose, and the resultant reaction mixture was analyzed on GLC. The data confirmed that the present enzyme forms maltose from trehalose. The results were as shown in Table 4.

Table 4

Substrate	A	B(%)	C(%)	D(%)
Maltose	Glucose	4.9	27.9	78.5
	Maltose	22.3	0.0	21.5
	Trehalose	72.8	72.1	0.0
Trehalose	Glucose	3.2	19.9	83.3
	Maltose	17.2	0.0	16.7
	Trehalose	79.6	80.1	0.0

Note : In the table, the symbol "A" means saccharides in the reaction mixture; the symbol "B", the saccharide composition of the reaction mixture formed by the present enzyme; the symbol "C", the saccharide composition of the reaction mixture treated with glucoamylase; and the symbol "D", the saccharide composition treated with trehalase.

As is evident from the results in Table 4, the

present enzyme converts maltose into trehalose and vice versa. It was revealed that the position of equilibrium inclined to the trehalose formation, i.e. the conversion rate of maltose into trehalose was about 70% or higher which was higher than that of trehalose into maltose.

Experiment 6

Influence of maltose concentration on trehalose formation

A solution containing 2.5, 5, 10, 20 or 40 w/v % maltose was mixed with 2 units/g maltose, d.s.b., of a purified maltose-trehalose converting enzyme obtained by the method in Experiment 2, and enzymatically reacted at 20°C and pH 7.0. During the enzymatic reaction, the reaction mixture was sampled and heated at 100°C for 10 min to inactivate the enzyme.

The total sugar content of the reaction mixture was determined by the anthrone-sulfuric acid method. The reducing sugar content was quantified in terms of glucose by the Somogyi-Nelson method, and the reducing power was determined as a ratio of the reducing sugar content against the total sugar content.

The sample was diluted to give a saccharide concentration of about one w/v %, subjected to "MOL-CUT II LGC", Japan Millipore Ltd., Tokyo, Japan, to removed protein, and analyzed for its saccharide composition on high-performance liquid chromatography (hereinafter abbreviated as "HPLC"). The apparatus and conditions used in the analysis were "CCPD SYSTEM", an HPLC apparatus commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan; "YMC-PACK PA-03", a column having a diameter of 4.6 mm and a length of 250 mm commercialized by YMC Co., Ltd.,

Tokyo, Japan; an eluent system of acetonitrile and water (= 78:22 by volume); a flow rate of 1.2 ml/min; and a differential refractometer as a detector. The results were as shown in Table 5.

Table 5

Concentration of maltose (%)	Reaction time (hour)	Reducing power (%)	Saccharide composition		
			Glucose	Maltose	Trehalose
2.5	0	50.3	0.0	100.0	0.0
2.5	2	36.7	1.3	68.8	29.9
	8	21.2	2.5	38.7	58.8
	23	12.3	3.8	17.2	79.0
	48	14.5	5.9	17.1	77.0
5.0	2	34.8	1.9	65.3	32.8
	8	20.2	2.6	35.7	61.7
	23	12.0	3.2	17.3	79.5
	48	14.2	5.7	17.3	77.0
10.0	2	32.2	1.3	63.0	35.7
	8	19.7	2.2	34.2	63.6
	23	12.5	3.6	17.5	78.9
	48	14.0	6.1	17.4	76.5
20.0	2	34.2	2.0	63.7	34.3
	8	20.2	2.9	35.1	62.0
	23	12.9	3.4	17.4	79.2
	48	15.1	6.0	17.4	76.6
40.0	2	34.8	1.6	68.2	30.2
	8	21.2	2.7	38.6	58.7
	23	12.8	3.7	17.7	78.6
	48	14.9	5.7	17.5	76.8

As is evident from the results in Table 5, the conversion reaction of maltose into trehalose smoothly proceeded independently on the maltose concentration in a conversion rate of about 80%.

Experiment 7

Effect of temperature on trehalose formation

A 20 w/v % maltose solution was mixed with 2 units/g maltose, d.s.b., of a purified maltose-trehalose converting enzyme obtained by the method in Experiment 2, and subjected to an enzymatic reaction at 5, 10, 15, 20 or 25°C. During the enzymatic reaction, the reaction mixture was sampled at a prescribed time interval, and the samples were heated at 100°C for 10 min to inactivate the enzyme. Similarly as in Experiment 6, the saccharide composition of the sample was analyzed on HPLC. The trehalose contents in the samples, which had been sampled at different temperatures and reaction times, were as shown in Table 6.

Table 6

Reaction time (hour)	Trehalose content (%)				
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
2	26.1	28.9	32.9	34.6	34.7
8	49.5	54.3	61.2	62.0	61.1
23	78.2	79.5	80.9	79.2	76.7
48	81.8	80.9	80.4	76.6	72.7

As is evident from the results in Table 6, the

trehalose formation rate tended to increase as the reaction temperature increased, and the conversion reaction from maltose into trehalose smoothly proceeded even at 5°C in a trehalose conversion rate of about 82%.

Experiment 8

Preparation of trehalose from maltose

Ten parts by weight of maltose commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, was dissolved in 40 parts by weight of water, and the solution was mixed with 2 units/g maltose, d.s.b., of a purified maltose-trehalose converting enzyme obtained by the method in Experiment 2, and subjected to an enzymatic reaction at 15°C and pH 7.0 for 48 hours, followed by heating the resultant reaction mixture at 100°C for 10 min to inactivate the remaining enzyme. The reaction mixture, containing about 74% trehalose, d.s.b., was decolored with an activated charcoal, desalted with ion-exchangers in H- and OH-form, concentrated into an about 78 w/v % solution which was then mixed with 0.1% crystalline trehalose as a seed crystal, d.s.b., followed by allowing it to stand at an ambient temperature overnight to effect crystallization. The resultant massecuite was separated into a crystal which was then sprayed and washed with a small amount of water, followed by the recovery of an about 3.0 parts by weight of a high-purity crystalline trehalose with a purity of 99.8%, d.s.b.

Experiment 9

Production of enzyme

One hundred ml aliquots of a liquid nutrient culture

medium, consisting of 2.0 w/v % glucose, 1.0 w/v % ammonium sulfate, 0.1 w/v % dipotassium hydrogenphosphate, 0.06 w/v % sodium dihydrogenphosphate, 0.05 w/v % magnesium sulfate, 0.3 w/v % calcium carbonate and water, were placed in 500-ml Erlenmeyer flasks, autoclaved at 115°C for 30 min to effect sterilization, cooled, and inoculated with a seed culture of *Pseudomonas putida* (FERM BP-4579), followed by the culture at 27°C for 24 hours under stirring conditions of 200 rpm. The resultant cultures were pooled and used as a seed culture.

About 20 L aliquot of a fresh preparation of the same liquid nutrient culture medium as used in the above culture was placed in a 30-L fermenter, sterilized, cooled to 27°C, and inoculated with one v/v % of the seed culture, followed by the culture under stirring and aerobic conditions at 27°C and a pH of 6.5-8.0 for about 20 hours.

The activity of a maltose-trehalose converting enzyme, accumulated in the resultant culture, was 0.12 units/ml. A portion of the culture was centrifuged to separate cells and a supernatant, and the cells were suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) to give the same volume of that of the portion, followed by assaying the enzyme activities in the cell suspension and the supernatant to reveal 0.11 units/ml and 0.01 units/ml respectively. The enzyme activity was assayed at 35°C.

Experiment 10

Purification the enzyme

The culture obtained in Experiment 9 was centrifuged to obtain an about 0.45 kg of wet cells which were then

suspended in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). About 2 L of the resultant cell suspension was treated with "MINI-RABO", a super-pressure cell disrupting apparatus commercialized by Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan, to disrupt cell, and the resultant mixture was centrifuged at 15,000xg for 30 min to obtain an about 1.7 L supernatant. Ammonium sulfate was added to the supernatant and dissolved therein to give a saturation degree of 0.7, allowed to stand at 4°C for 4 hours, and centrifuged to obtain the resultant sediment.

The sediment was dissolved in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), and the solution was dialyzed against a fresh preparation of the same buffer for 24 hours, and centrifuged to remove insoluble substances. Four hundred ml of the dialyzed solution was divided into two portions, which were respectively subjected to ion-exchange column chromatography using a column packed with 300 ml of "DEAE-TOYOPEARL® GEL", a gel commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan.

The present maltose-trehalose converting enzyme adsorbed on the gel, and eluted therefrom with a fresh preparation of the same buffer supplemented with salt. The fractions with the enzyme activity were recovered, and subjected to ion-exchange column chromatography using a column packed with 80 ml of "DEAE-TOYOPEARL® GEL". The maltose-trehalose converting enzyme adsorbed on the gel was eluted therefrom with a liner gradient of salt ranging from 0.1 to 0.3 M, followed by recovering fractions with the enzyme activity.

The fractions were pooled and subjected to gel filtration column chromatography using a column packed with 400

ml of "TOYO-PEARL HW-55S", a gel commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, followed by recovering the eluted fractions with the enzyme activity. The total activity, specific activity and yield in each purification step are tabulated in Table 7.

Table 7

Purification step	Total enzyme* activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Supernatant after cell disruption	1,750	0.04	100
Dialyzed solution after salting out	1,200	0.07	68.5
First eluate from ion-exchange column	1,090	0.53	62.3
Second eluate from ion-exchange column	360	4.5	20.6
Eluate from gel filtration column	156	6.5	8.9

Note : The symbol "*" means the present maltose-trehalose converting enzyme.

The purified enzyme preparation was subjected to gel electrophoresis by using a 7.5 w/v % sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel to give a single protein band. This meant that it was a relatively-high purity preparation.

Experiment 11

Property of enzyme

A portion of a purified maltose-trehalose converting

enzyme preparation, obtained by the method in Experiment 10, was electrophoresed by using a 7.5 w/v % sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel, and determined its molecular weight to be about 110,000-120,000 daltons by comparing it with marker proteins, commercialized by Japan Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan, which had been simultaneously electrophoresed.

Another portion of the purified maltose-trehalose converting enzyme preparation was isoelectrophoresed by using a polyacrylamide gel containing 2 w/v % "AMPHOLINE", an ampholyte commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden. Thereafter, the resultant gel was sliced into pieces, followed by measuring their pHs to reveal the pI of the enzyme being about 4.1-5.1.

Effects of temperature and pH on the activity of the present enzyme were studied in accordance with the method as used for assaying the enzyme activity. The results were respectively shown in FIG. 5 (effect of temperature) and FIG. 6 (effect of pH). The optimum temperature of the enzyme was about 20°C when incubated at pH 7.0 for 60 min and the optimum pH was about 7.3-8.3 when incubated at 35°C for 60 min. The thermal stability of the enzyme was determined by incubating it in containers with 50 mM phosphate buffers (pH 7.0) at different temperatures for 60 min, cooling the resultant buffers in the containers with cold water, and assaying the residual enzyme activity in each buffer. The pH stability of the enzyme was determined by incubating it in 50 mM phosphate buffers having different pHs at 35°C for 60 min, adjusting the resultant buffers to pH 7.0, and assaying the residual enzyme

activity in each buffer. The results of the thermal- and pH-stabilities of the enzyme were respectively shown in FIG.s 7 and 8. The enzyme was stable up to a temperature of about 40°C and stable at a pH of about 6.0-9.5. One mM Cu⁺⁺ or Hg⁺⁺ and 50 mM Tris-HCl buffer were inhibitory to the present enzyme.

Experiment 12

Action on saccharides

A variety of saccharides were tested for determining whether they could be used as a substrate for the present enzyme from *Pseudomonas putida* H262, obtained in Experiment 10, in accordance with the method in Experiment 4 except for setting the reaction temperature to 35°C. Similarly as the enzyme from *Pseudomonas putida* H262, the enzyme from *Pimelobacter* sp. R48 specifically acted on maltose and trehalose, i.e., it converted maltose into trehalose and vice versa. It was revealed that the position of equilibrium inclined to the formation of trehalose, i.e. the conversion rate of maltose into trehalose was as high as about 70%.

Experiment 13

Influence of maltose concentration

on the formation of trehalose

To a solution containing 5, 10, 20 or 30% maltose was added 2 units/g maltose, d.s.b., of a purified maltose-trehalose converting enzyme obtained by the method in Experiment 10, and the solution was subjected to an enzymatic reaction at 35°C and pH 7.0 while sampling the reaction mixture at a prescribed time interval. The samples were heated at 100°C for 10 min to inactivate the remaining enzyme.

The samples were determined on their reducing powers and saccharide compositions similarly as in Experiment 6. The results were as shown in Table 8.

Table 8

Concentration of maltose (%)	Reaction time (hour)	Reducing power (%)	Saccharide composition (%)		
			Glucose	Maltose	Trehalose
5.0	0	50.3	0.0	100.0	0.0
24	2	43.8	0.8	88.0	11.2
	7	35.0	0.5	72.7	26.8
	24	17.2	0.5	41.8	57.7
	48	10.3	1.8	29.7	68.5
10.0	2	46.8	1.2	86.5	12.3
	7	34.6	1.4	64.9	33.7
	24	16.0	2.2	36.4	61.4
	48	14.8	3.7	26.5	69.8
20.0	2	44.9	0.7	86.6	12.7
	7	32.7	1.2	66.6	32.2
	24	21.0	2.6	35.8	61.6
	48	11.2	3.9	27.0	69.1
30.0	2	44.8	0.0	89.5	10.5
	7	38.2	0.6	72.5	26.9
	24	17.8	1.8	41.8	56.4
	48	12.9	3.9	29.6	66.5

As is evident from the results in Table 8, the present enzyme formed about 70% trehalose from maltose as a substrate independently on the concentration.

Experiment 14

Preparation of trehalose from maltose

Ten parts by weight of maltose commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, was dissolved in 40 parts by weight of water, and the solution was mixed with 2 units/g maltose, d.s.b., of the present purified maltose-trehalose converting enzyme, and subjected to an enzymatic reaction at 35°C and pH 7.0 for 48 hours, followed by heating the resultant reaction mixture at 100°C for 10 min to inactivate the remaining enzyme. The reaction mixture, containing about 69% trehalose, d.s.b., was decolored with an activated charcoal, desalted with ion-exchangers in H- and OH-form, and concentrated into an about 78 w/v % solution which was then mixed with 0.1% crystalline trehalose as a seed crystal, d.s.b., followed by allowing it to stand at an ambient temperature overnight to effect crystallization. The resultant massecuite was separated into a crystal which was then sprayed and washed with a small amount of water, followed by the recovery of an about 2.3 parts by weight of a high-purity crystalline trehalose with a purity of 99.7%.

Experiment 15

Production of enzyme

One hundred ml aliquots of a liquid nutrient culture medium, consisting of 0.5 w/v % polypeptone, 0.1 w/v % yeast extract, 0.07 w/v % sodium nitrate, 0.01 w/v % dipotassium

hydrogenphosphate, 0.02 w/v % magnesium sulfate, 0.01 w/v % calcium chloride and water, were adjusted to pH 7.5, placed in 500-ml Erlenmeyer flasks, autoclaved at 120° C for 20 min to effect sterilization, cooled, and inoculated with a seed culture of *Thermus aquaticus* (ATCC 33923), followed by the culture at 60° C for 24 hours under stirring conditions of 200 rpm. The resultant cultures were pooled and used as a seed culture.

About 20 L aliquots of a fresh preparation of the same liquid nutrient culture medium as used in the above culture were placed in two 30-L fermenters, sterilized, cooled to 60° C, and inoculated with one v/v % of the seed culture, followed by the culture under stirring and aerobic conditions at 60° C and a pH of 6.5-8.0 for about 20 hours.

The activity of a maltose-trehalose converting enzyme, accumulated in the resultant culture, was 0.35 units/ml. A portion of the culture was centrifuged to separate cells and a supernatant, and the cells were suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) to give the same volume of that of the portion, followed by assaying the enzyme activities in the cell suspension and the supernatant to reveal 0.33 units/ml and 0.02 units/ml respectively. The enzyme activity was assayed at 60° C.

Experiment 16

Purification the enzyme

The culture obtained in Experiment 15 was centrifuged to obtain an about 0.28 kg of wet cells which were then suspended in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). About 1.9 L of

the resultant cell suspension was treated with "MODEL US300", an ultrasonic disintegrator commercialized by Nippon Seiki Co., Ltd., Niigata, Japan, to disrupt cells. The resultant mixture was centrifuged at 15,000×g for 30 min to obtain an about 1.8 L supernatant. Ammonium sulfate was added to the supernatant and dissolved therein to give a saturation degree of 0.7, and the solution was allowed to stand at 4°C for 4 hours, and centrifuged to obtain the resultant sediment.

The sediment was dissolved in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), and the solution was dialyzed against a fresh preparation of the same buffer for 24 hours, and centrifuged to remove insoluble substances. The dialyzed solution, 1,560 ml by volume, was divided into three portions which were respectively subjected to ion-exchange column chromatography using a column packed with 530 ml of "DEAE-TOYOPEARL® 650 GEL", a gel commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan.

The present maltose-trehalose converting enzyme adsorbed on the gel, and eluted therefrom with a fresh preparation of the same buffer supplemented with salt. The fractions with the enzyme activity were recovered, dialyzed against a fresh preparation of the same buffer supplemented with one M ammonium sulfate, and subjected to hydrophobic column chromatography using a column packed with 380 ml of "BUTYL-TOYOPEARL® 650 GEL", a hydrophobic gel commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan. The maltose-trehalose converting enzyme adsorbed on the gel was eluted therefrom with a linear gradient of salt ranging from 1 M to 0 M, followed by

recovering fractions with the enzyme activity.

The fractions were pooled and subjected to gel filtration column chromatography using a column packed with 380 ml of "TOYOPEARL HW-55S", a gel commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, followed by recovering the eluted fractions with the enzyme activity.

The fractions were pooled and subjected to ion-exchange chromatography using a column packed with 1.0 ml of "MONO Q HR-5/5" commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden. The enzyme was eluted from the column with a linear gradient of salt ranging from 0.1 M to 0.35 M, followed by recovering fractions with the enzyme activity.

The total activity, specific activity and yield in each purification step are tabulated in Table 9.

Table 9

Purification step	Total enzyme* activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)
Supernatant after cell disruption	8,800	0.10	100
Dialyzed solution after salting out	8,710	0.16	99.0
Eluate from ion-exchange column	5,690	2.5	64.7
Eluate from hydrophobic column	2,050	17.6	23.3
Eluate from gel filtration column	937	113	10.6
Eluate from ion-exchange column	467	135	5.3

Note : The symbol "*" means the present maltose-trehalose converting enzyme.

The purified enzyme preparation was electrophoresed by using a 5 w/v % sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel to give a single protein band. This meant that it was a relatively-high purity preparation.

Experiment 17

Property of enzyme

A portion of a purified maltose-trehalose converting enzyme preparation, obtained by the method in Experiment 16, was electrophoresed by using a gel containing 7.5 w/v % sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel, and determined its molecular weight to be about 100,000-110,000 daltons by comparing it with marker proteins, commercialized by Japan Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan, which had been simultaneously electrophoresed.

Another portion of the purified maltose-trehalose converting enzyme preparation was isoelectrophoresed by using a polyacrylamide gel containing 2 w/v % "AMPHOLINE", an ampholyte commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden. Thereafter, the resultant gel was sliced into pieces, followed by measuring their pHs to reveal the pI of the enzyme being about 3.8-4.8.

Effects of temperature and pH on the activity of the present enzyme were studied in accordance with the method as used for assaying the enzyme activity. The results were respectively shown in FIG. 9 (effect of temperature) and FIG. 10 (effect of pH). The optimum temperature of the enzyme was about 65°C when incubated at pH 7.0 for 60 min and the optimum pH was about 6.0-6.7 when incubated at 60°C for 60 min. The

thermal stability of the enzyme was determined by incubating it in containers with 50 mM phosphate buffers (pH 7.0) at different temperatures for 60 min, cooling the resultant buffers in the containers with cold water, and assaying the residual enzyme activity in each buffer. The pH stability of the enzyme was determined by incubating it in 50 mM phosphate buffers having different pHs at 60°C for 60 min, adjusting the resultant buffers to pH 7.0, and assaying the residual enzyme activity in each buffer. The results of the thermal- and pH-stabilities of the enzyme were respectively shown in FIG.s 11 and 12. The enzyme was stable up to a temperature of about 80°C and stable at a pH of about 5.5-9.5. One mM Cu⁺⁺ or Hg⁺⁺ and 50 mM Tris-HCl buffer were inhibitory to the present enzyme.

Experiment 18

Action on saccharides

A variety of saccharides were tested for determining whether they could be used as a substrate for the present enzyme from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923), obtained in accordance with the method in Experiment 4 except for setting the reaction temperature to 50°C. Similarly as the enzymes from *Pimelobacter* sp. R48 and *Pseudomonas putida* H262, the enzyme from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) specifically acted on maltose and trehalose, i.e., it converted maltose into trehalose and vice versa. It was revealed that the position of equilibrium inclined to the formation of trehalose, i.e. the conversion rate of maltose into trehalose was about 70% or higher.

Experiment 19

Influence of maltose concentration

on the formation of trehalose

To a solution containing 2.5, 5, 10, 20 or 40% maltose was added 2.5 units/g maltose, d.s.b., of a purified maltose-trehalose converting enzyme derived from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) obtained by the method in Experiment 16, and the solution was subjected to an enzymatic reaction at 60°C and pH 6.5. The reaction mixture was sampled at 72 hours after the initiation of the enzymatic reaction, and heated to inactivate the remaining enzyme at 100°C for 30. The sample was determined on the reducing power and saccharide composition similarly as in Experiment 6. The results were as shown in Table 10.

Table 10

Concentration of maltose (%)	Reaction time (hour)	Reducing power (%)	Saccharide composition (%)		
			Glucose	Maltose	Trehalose
2.5	0	50.3	0.0	100.0	0.0
2.5	72	16.3	4.5	25.2	70.3
5.0	72	15.9	4.4	25.6	70.0
10.0	72	16.0	4.7	25.6	69.7
20.0	72	16.6	4.4	26.2	69.4
40.0	72	16.8	5.0	26.4	68.6

As is evident from the results in Table 10, the present enzyme formed about 70% trehalose from maltose as a substrate independently on the concentration.

Experiment 20

Influence of temperature on the formation of trehalose

To 20% maltose solution having pH 6.5 was added 2.5 units/g maltose, d.s.b., of a maltose-trehalose converting enzyme derived from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) obtained by the method in Experiment 16, and the mixture was subjected to an enzymatic reaction at 40, 50 60 or 70°C while sampling at a prescribed time interval. The samples were heated at 100°C for 30 min to inactivate the remaining enzyme. The resultant solutions were analyzed on their saccharide compositions on HPLC similarly as in Experiment 6. The trehalose content at different temperatures and reaction times were as shown in Table 11.

Table 11

Reaction time (hour)	Trehalose content (%)			
	40°C	50°C	60°C	70°C
4	45.0	55.7	56.8	50.3
8	61.0	67.3	64.3	58.5
24	79.1	76.5	71.1	64.3
48	80.7	76.9	70.2	62.8
72	80.0	76.4	68.5	60.2

As is evident from the results in Table 11, the conversion rate of maltose into trehalose becomes higher the

lower the enzymatic reaction temperature. The enzyme converted maltose into trehalose in a conversion rate of about 80%.

Experiment 21

Production and property of maltose-trehalose

converting enzyme from microorganism

Among conventional microorganisms, a microorganism which had been confirmed its ability to form the present maltose-trehalose converting enzyme was incubated in an Erlenmeyer flask for 48 hours in accordance with Experiment 15. After analyzed the enzyme activity, the resultant culture was subjected to a cell disrupting apparatus in accordance with Experiment 16. From the resultant mixture a supernatant was prepared and dialyzed to obtain a partially purified enzyme, followed by analyzing the property in accordance with Experiment 17. The results were as shown in Table 12.

Table 12

Microorganisms	Activity (unit/ml)	Optimum temperature ($^{\circ}$ C)	Optimum pH	Thermal stability ($^{\circ}$ C)	pH Stability
<i>Thermus aquaticus</i> (ATCC 27634)	0.30	About 65	About 6.0-6.5	Up to 80	About 5.5-9.5
<i>Thermus ruber</i> (ATCC 35948)	0.26	About 50	About 6.0-7.0	Up to 50	About 5.5-10.0
<i>Thermus</i> sp. (ATCC 43815)	0.25	About 65	About 6.0-6.5	Up to 80	About 5.5-9.5
<i>Pimelobacter</i> sp. (ATCC 43815) described in Experiments 1-3	0.55	About 20	About 7.0-8.0	Up to 30	About 6.0-9.0
<i>Pseudomonas putida</i> described in Experiments 12-14	0.12	About 37	About 7.3-8.3	Up to 40	About 6.0-9.5
<i>Thermus aquaticus</i> (ATCC 33923) described in Experiments 18-20	0.35	About 65	About 6.0-6.7	Up to 80	About 5.5-9.5

Partially purified enzymes derived from known microorganisms of the genus *Thermus* as shown in Table 12 were studied on their action on a variety of saccharides in accordance with the method in Experiment 18. As a result, it was revealed that similarly as the enzyme derived from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) the partially purified enzymes only acted on maltose and trehalose, and formed trehalose from maltose.

It was revealed that a maltose-trehalose converting enzyme derived from *Thermus ruber* (ATCC 35948) showed a lower optimum temperature and a lower stable temperature than that of *Thermus aquaticus* (ATCC 33923), while enzymes derived from microorganisms of the genus *Thermus* had approximately the same property of that of *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) as well as having a relatively-high thermal stability.

Experiment 22

Partial amino acid sequence of

maltose-trehalose converting enzyme

A portion of a purified enzyme preparation derived from *Pimelobacter* sp. R48 obtained by the method in Experiment 2, *Pseudomonas putida* H262 obtained by the method in Experiment 10, or *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) obtained by the method in Experiment 16 was dialyzed against distilled water, and an about 80 μ g of the resultant protein was used as a sample for analyzing a partial amino acid sequence containing the N-terminal of the enzyme. The N-terminal was analyzed on "PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A", a protein sequencer

commercialized by Applied Biosystems Inc., Foster City, USA. The partial amino acid sequences containing the N-terminals of the enzymes were as shown in Table 13.

Table 13

Microorganism	Partial amino acid sequence containing the N-terminal		
<i>Pseudomonas putida</i> H262	Gly-Lys-Trp-Pro-Arg-Pro-Ala-Ala-Phe-Ile- 1 5 10 Asp		
<i>Pimelobacter</i> sp. R48	Ser-Thr-Val-Leu-Gly-Glu-Glu-Pro-Glu-Trp- 1 5 10 Phe-Arg-Thr-Ala-Val-Phe-Tyr-Glu 15		
<i>Thermus aquaticus</i> ATCC 33923	Met-Asp-Pro-Leu-Trp-Tyr-Lys-Asp-Ala-Val- 1 5 10 Ile-Tyr-Gln		

Note : In the Table, each figure means the number of amino acids counted from the N-terminal of each partial amino acid sequence.

As is evident from the results in Table 13, it was revealed that the enzymes derived from *Pimelobacter* sp. R48, *Pseudomonas putida* H262, and *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) had partial amino acid sequences which showed a considerably high homology. A relatively-high homology was found between a partial amino acid sequence ranging from the 10th amino acid "Trp" to the 16th amino acid of "Phe" derived from a microorganism of the genus *Pimelobacter* and that ranging from the 3rd amino acid of "Trp" to the 9th amino acid of "Phe" derived from a microorganism of the genus *Pseudomonas*. The

partial amino acid sequence can be shown as Trp-X₁-Arg-X₂-Ala-X₃-Phe (where the symbol "X₁" means "Phe" or "Pro"; the symbol "X₂", "Thr" or "Pro"); and the symbol "X₃", "Val" or "Ala"). A relatively-high homology was found between a partial amino acid sequence ranging from the 14th amino acid of "Ala" to the 17th amino acid of "Tyr" derived from a microorganism of the genus *Pimelobacter* and that ranging from the 9th amino acid of "Ala" to the 12th amino acid of "Tyr" derived from a microorganism of the genus *Thermus*. The partial amino acid sequence can be shown as Ala-Val-X₄-Try (where the symbol "X₄" means "Phe" or "Ile").

Experiment 23

Physicochemical property of trehalose

A high-purity trehalose specimen prepared by the method in Experiment 8 was studied on its physicochemical property. As a result, the melting point was determined as 97.0°C, the specific rotation was $[\alpha]_D^{20} +199^\circ\text{C}$ (c=5), the heat of fusion was 57.8kJ/mole, and the solubility in water at 25°C was 77.0g for anhydrous trehalose. These data were well agreed with those of a commercially available hydrous crystalline trehalose commercialized by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan, which was experimented along with the above experiments.

Experiment 24

Utilization test *in vivo*

In accordance with the method as reported by H. Atsuji et al. in *Journal of Clinical Nutrition*, Vol.41, No.2, pp.200-208 (1972), 30 g of the high-purity trehalose specimen

with a purity of 99.8%, d.s.b., in Experiment 8 was prepared into a 20 w/v % aqueous solution which was then orally administered to 3 healthy male volunteers of 26-, 27- and 30-year-old, and their bloods were sampled at prescribed time intervals, followed by the measurements of the blood sugar- and insulin-levels. As a control, glucose was used. As a result, trehalose behaved similarly as glucose, and the maxima of blood sugar- and insulin-levels were observed at an about 0.5-1 hour after the administration. This revealed that the present trehalose is readily digested, absorbed and metabolized by living bodies and utilized as an energy source. Thus, the present trehalose and saccharide composition containing the same are suitably used as an energy-supplementing saccharide.

Experiment 25

Acute toxicity test

By using mice, the high-purity trehalose specimen with a purity of 99.8%, d.s.b., prepared in Experiment 8 was orally administered to the mice for its acute toxicity test. The result revealed that the present trehalose is a relatively-low toxic substance, and no mouse died even when administered with the highest level of dose administrable to the mice. Though it is not so accurate, the LD₅₀ was determined to be 50 g/kg or higher.

The present trehalose and saccharide composition containing the same, prepared with the present maltose-trehalose converting enzyme, as well as their preparations, are illustrated in Example A. The present compositions containing either the trehalose or the saccharide composition containing the same are illustrated in Example B:

Example A-1

In accordance with the method in Experiment 1, a seed culture of a microorganism of the species *Pimelobacter* sp. R48 (FERM BP-4315) was cultured by a fermenter for about 60 hours under aeration and agitation conditions in a fresh preparation of the same nutrient culture medium as used in Experiment 1 except for adjusting the glucose concentration to 4.0 w/v %. The activity of the present maltose-trehalose converting enzyme in the resultant culture was 0.75 units/ml. A portion of the culture was centrifugally separated into cells and a culture supernatant which were then assayed their enzyme activity. As a result, about 65% of the enzyme activity was observed in the cells and about 35% of the enzyme activity was observed in the culture supernatant. An about 35 L culture containing cells was treated with "MINI-RABO", a super high-pressure cell disrupting apparatus commercialized by Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan, to disrupt the cells. The resultant cell suspension was centrifuged to obtain a supernatant which was then membrane filtered with a UF-membrane, followed by recovering an about 1.2 L concentrate containing about 15 units/ml of the present maltose-trehalose converting enzyme.

To a 10 w/v % suspension (pH 5.5) of potato starch was added 2 units/g starch, d.s.b., of "SPITASE HS", an α -amylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals Ltd., Kyoto, Japan, and the resultant mixture was gelatinized and liquefied under stirring and heating conditions, followed by immediately keeping the mixture at 120°C for 20 min and adjusting the resultant to 50°C and pH 5.0. The mixture thus obtained was mixed with 20 units/g starch, d.s.b., of a β -amylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals Ltd.,

Kyoto, Japan, and 500 units/g starch, d.s.b., of an isoamylase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and the resultant mixture was subjected to an enzymatic reaction for 24 hours to obtain a saccharide solution containing about 92 w/v % maltose. The reaction mixture was heated at 100°C for 20 min, heated to 10°C, adjusted to pH 7.0, mixed with one unit/g dry matter of the maltose-trehalose converting enzyme prepared in the above, and subjected to an enzymatic reaction for 96 hours.

The reaction mixture was kept at 95°C for 10 min, cooled, decolored and filtered in usual manner with an activated charcoal. The filtrate was purified by desalting it with ion exchangers in H- and OH-form, and concentrated to obtain a syrup with a concentration of about 70 w/v % in a yield of about 95%, d.s.b.

The product, containing about 69% trehalose, d.s.b., and having a reducing power as low as DE 18.2, has a mild sweetness as well as an appropriate viscosity and moisture-retaining ability, and because of these it is suitably used as a sweetener, taste-improving agent, stabilizer, diluent, excipient and filler in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

Example A-2

A reaction mixture, wherein an enzymatic reaction of a maltose-trehalose conversion had been suspended, was prepared by the method in Example A-1, mixed with 10 units/g "GLUCOZYME", a glucoamylase commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan, and subjected to an enzymatic reaction at pH 5.0 and 50°C for 24 hours. The resultant reaction mixture was heated to inactivate the remaining enzyme,

decolored, desalted and purified to obtain a saccharide solution as a feed solution. The saccharide solution was subjected to ion-exchange column chromatography using "XT-1016 (Na⁺-form, polymerization degree of 4%)" commercialized by Tokyo Organic Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan. The resins were packed in 4-jacketed stainless-steel columns, having an inner diameter of 5.4 cm, cascaded in series to give a total gel-bed-depth of 20 m.

While keeping the inner column temperature at 60°C, the saccharide solution was fed to the columns in an amount of 5 v/v %, fractionated by feeding to the columns 60°C hot water at SV (space velocity) 0.15 to remove glucose, followed by recovering a high trehalose content fractions. The fractions were pooled, purified, concentrated, dried *in vacuo* and pulverized to obtain a high trehalose content powder in a yield of about 55%, d.s.b.

The product, containing about 97% trehalose, d.s.b., and having a satisfactorily-low reducing power as well as a mild and high-quality sweetness, can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, diluent, excipient and filler in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

Example A-3

A high trehalose content fraction obtained by the method in Example A-2 was in usual manner decolored with an activated charcoal, desalted and purified with an ion-exchanger. The filtrate was concentrated into an about 70 w/v % solution which was then placed in a crystallizer, admixed

with about 2% hydrous crystalline trehalose as a seed crystal, and gradually cooled to obtain a massecuite with a crystallinity of about 45%. The massecuite was sprayed from a nozzle equipped at the top of a drying tower at a high pressure of 150 kg/cm². In the spraying step, the massecuite was simultaneously ventilated with 85°C hot air being sent from the top of the drying tower, and the resultant crystalline powder was collected on a metal wire netting conveyer provided on the basement of the drying tower, and gradually moved out from the drying tower while a stream of 45°C air was passing upwards through the metal wire netting. The resultant crystalline powder was injected in an ageing tower and aged for 10 hours to complete the crystallization and drying, followed by recovering the resultant hydrous crystalline trehalose powder in a yield of about 90% against the material high trehalose content fraction, d.s.b.

The product is substantially non-hygroscopic and handles easily, and these render it arbitrarily useful in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent and stabilizer.

Example A-4

A high trehalose content fraction obtained by the method in Example A-2 was purified similarly as in Example A-3, and the resultant was placed in an evaporator, and boiled up in vacuo to obtain a syrup with a moisture content of about 3.0%. The resultant syrup was placed in a crystallizer, admixed with one % anhydrous crystalline trehalose against the syrup, d.s.b., and crystallized at 120°C under stirring

conditions, and the resultant mixture was placed in a aluminum plain container and aged at 100°C for 6 hours to form a block.

The resultant block was pulverized by a cutter and dried by a fluidized-bed drying to obtain an anhydrous crystalline trehalose powder with a moisture content of about 0.3% in a yield of about 85% against the material high trehalose content fraction, d.s.b.

The product can be arbitrarily used as a desiccant in food products, cosmetics, pharmaceuticals, and their materials and intermediates, and also can be used as a white powdery sweetener in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

Example A-5

In accordance with the method in Experiment 1, a seed culture of *Pimelobacter* sp. R48 (FERM BP-4315) was inoculated to and cultured in a nutrient culture medium, and the resultant culture was centrifuged to obtain 100 g wet cells, having an activity of about 800 units of the present enzyme, which were then kneaded with 100 ml of 10 mM phosphate buffer in which 2.5% sodium alginate, having a viscosity of 300-400 cp, commercialized by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan, was previously dissolved in 10 mM phosphate buffer. The resultant slurry containing the cells was successively dropped into 0.1 M calcium chloride solution stirred by a magnetic stirrer from a height of about 20 cm above the surface of the solution to form spherical gels having a diameter of about 2 mm. The gels were allowed to stand in the solution at an ambient temperature for about 2 hours and filtered with a Buchner funnel, followed by recovering cells immobilized with

alginate. The resultant immobilized cells were packed in a jacketed glass-column, 30 mm in diameter and 200 mm in length, and the column was heated and kept at 20°C. A 40% maltose solution (pH 6.8) was fed to the column at SV 0.2 to flow it downward to obtain a saccharide solution containing about 70% trehalose, d.s.b. The saccharide solution thus obtained was purified and concentrated to obtain a syrup with a concentration of about 70% in a yield of about 95%, d.s.b.

The product has a relatively-low reducing power and a mild sweetness as well as an appropriate moisture-retaining ability, and because of these it can be arbitrarily used in a variety of compositions similarly as the product in Example A-1.

Example A-6

A 33% corn starch suspension was mixed with calcium carbonate to give a final concentration of 0.1%, and the mixture was adjusted to pH 6.5 which was then mixed with 0.2 units/g starch, d.s.b., of "TERMAMYL 60L", an α -amylase specimen commercialized by Novo Industri A/S Copenhagen Denmark, and subjected to an enzymatic reaction at 95°C for 15 min. The reaction mixture was autoclaved at 120°C for 30 min, cooled to 55°C, admixed with 500 units/g starch, d.s.b., of an isoamylase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and 30 units/g starch, d.s.b., of a β -amylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals Ltd., Kyoto, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 48 hours, followed by recovering a saccharide solution with a maltose content of about 84%, d.s.b. The saccharide solution was kept at 100°C for 10 min, cooled to 15°C, mixed with 1.5 units/g starch, d.s.b., of the present

maltose-trehalose converting enzyme obtained by the method in Example A-1, and subjected to an enzymatic reaction for 72 hours. The resultant reaction mixture was heated at 100°C for 15 min to inactivate the remaining enzyme and decolored in usual manner with an activated charcoal, desalted and purified with an ion-exchanger, followed by concentrating the resultant to obtain a syrup with a concentration of about 70% in a yield of about 95%, d.s.b.

The product contains about 64% trehalose, d.s.b., and has a relatively-low reducing power and a mild sweetness as well as an appropriate moisture-retaining ability, and because of these it can be arbitrarily used in a variety of compositions similarly as the product in Example A-1.

Example A-7

A syrup obtained by the method in Example A-5 was concentrated into an about 82% syrup which was then placed in a crystallizer, admixed with an about one % seed crystal, transferred to a plain vessel, and allowed to stand at 20°C for 4 days to effect crystallization. The resultant crystal was pulverized by a cutter and dried to obtain a massecuite-type hydrous crystalline trehalose powder in a yield of about 95%, d.s.b.

The product does not substantially exhibit hygroscopicity and handles easily, and because of these it can be arbitrarily used similarly as the product in Example A-1 in a variety of compositions.

Example A-8

A syrup obtained by the method in Example A-6 was concentrated into an about 80% syrup which was then placed in a crystallizer, admixed with an about one % of hydrous

crystalline trehalose as a seed crystal, and cooled under stirring conditions to effect crystallization. The resultant was separated with a basket-type centrifuge to obtain a crystal which was then sprayed with a small amount of cold water to obtain a high-purity hydrous crystalline trehalose in a yield of about 20%, d.s.b.

The product which exhibits the same physicochemical properties as shown in Experiment 23 can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals, as well as industrial reagents and chemical materials.

Example A-9

A seed culture of *Pseudomonas putida* H262 (FERM BP-4579) was inoculated in a nutrient culture medium, and, in accordance with the method in Experiment 9, fermented by a fermentor for about 20 hours under stirring and aerobic conditions. An about 18 L of the resultant culture was centrifuged to obtain an about 0.4 kg wet cells which were then suspended in 4 L of 10mM phosphate buffer, treated with "MODEL US300", an ultrasonic disintegrator commercialized by Nippon Seiki Co., Ltd., Niigata, Japan, to disrupt cells. The resultant mixture was centrifuged to obtain a supernatant which was then concentrated with a UF-membrane, followed by recovering an about 400 ml of a concentrated enzyme solution containing 3.8 units/ml of a maltose-trehalose converting enzyme. Ten % potato suspension (pH 5.5) was mixed with 2 units/g starch, d.s.b., of "SPITASE HS", an α -amylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan,

gelatinized and liquefied by heating under stirring conditions, followed by autoclaving at 120°C for 20 min, cooling to 50°C and adjusting to pH 5.5. To the resultant mixture was added 500 units/g starch, d.s.b., of a pullulanase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and 20 units/g starch, d.s.b., of a β -amylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 24 hours, followed by recovering a saccharide solution containing about 92% maltose. The saccharide solution was heated at 100°C for 20 min, adjusted to 40°C and pH 7.0, mixed with 1.5 units/g of the maltose-trehalose converting enzyme prepared in the above, and subjected to an enzymatic reaction for 72 hours. The reaction mixture was heated at 95°C for 10 min, cooled, and, in usual manner, decolored and filtered with an activate charcoal, followed by desalting and purifying the resultant with ion-exchangers in H- and OH-form, and concentrating the resultant solution to obtain a syrup with a concentration of about 70 w/v % in a yield of about 97%, d.s.b. The product contained about 65% trehalose, d.s.b., and had a relatively-low reducing power as low as DE 16.2, as well as having a moderate sweetness and an adequate viscosity and moisture-retaining ability, and because of these it can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, stabilizer, filler, diluent and excipient in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

Example A-10

A post-reaction mixture of maltose-trehalose converting enzyme obtained by the method in Example A-9 was heated at 95°C for 10 min to inactivate the remaining enzyme,

adjusted to pH 5.0 and 55°C, mixed with 10 units/g starch, d.s.b., of "GLUCOZYME", a glucoamylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 24 hours. The reaction mixture was in usual manner heated to inactivate the remaining enzyme, decolored, desalted, purified, concentrated into a 55% saccharide solution. Similarly as in Example A-2, the resultant saccharide solution was subjected to column chromatography using "DOWEX 99 (Ca⁺⁺-form, polymerization degree of 6%)", an alkaline-earth metal strong-acid cation exchanger commercialized by Dow Chemical Co., Midland, Michigan, USA, followed by recovering high trehalose content fractions. The fractions were pooled, purified and continuously crystallized while concentrating, and the resultant massecuite was separated by a basket-type centrifuge, followed by spraying the resultant crystal with a small amount of water to obtain a high purity hydrous crystalline trehalose in a yield of about 25%, d.s.b. The product exhibits the same physicochemical properties as the product in Experiment 23, and, similarly as the product in Example A-8, it can be arbitrarily used in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals, as well as industrial reagents and chemical materials.

Example A-11

A seed culture of *Pseudomonas putida* H262 (FERM BP-4579) was culture in a nutrient culture medium similarly as in Experiment 9, and the resultant cells were recovered by centrifugation to obtain 100 g wet cells having a maltose-trehalose converting enzyme activity of about 400 units which

were then kneaded with 100 ml of 10 mM phosphate buffer in which 2.5% sodium alginate having a viscosity of 300-400 cp had been dissolved. The slurry containing the cells were continuously dropped into 0.1 M CaCl₂ solution stirred by a magnetic stirrer from a height of about 20 cm above the surface of the solution to form spherical gels having a diameter of about 2 mm. The gels were kept in the CaCl₂ solution at an ambient temperature for about 2 hours, filtered with a Buchner funnel to obtain cells immobilized with sodium alginate. The immobilized cells were packed in a jacketed glass-column having a diameter of 30 mm and a length of 200 mm and kept at 35°C. The column was fed with a downstream of 40% maltose solution (pH 6.8) at SV 0.1 to obtain a 67% trehalose solution. In accordance with the method in Example A-9, the trehalose solution was purified, concentrated, crystallized, and spray dried to obtain a massecuite-type hydrous crystalline trehalose powder in a yield of about 90%, d.s.b. The product has a relatively-low reducing power, a mild sweetness and an adequate moisture-retaining ability, and because of these it can be arbitrarily used as a variety of compositions similarly as the product in Example A-9.

Example A-12

A seed culture of *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) was inoculated in a nutrient culture medium, and, in accordance with the method in Experiment 15, cultured for about 20 hours under agitation-aeration conditions. The culture had an activity of about 0.32 units/ml of a maltose-trehalose converting enzyme. 0.18 kg wet cells recovered from an about 18 L of the culture were suspended in 10 mM phosphate buffer

(pH 7.0). An about 1.5 L of the cell suspension was treated with an ultrasonic disintegrator to disrupt the cells. The resultant cell debris was centrifuged, and the supernatant was recovered which was then concentrated with a UF-membrane to obtain an about 500 ml concentrate having an activity of about 10 units/ml of a maltose-trehalose converting enzyme. To 15% corn starch suspension (pH 5.5) was added 2 units/g starch of "SPITASE HS", an α -amylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan, and gelatinized and liquefied under stirring and heating conditions. Immediately after that the mixture was autoclaved at 120°C for 20 min, cooled to 55°C and adjusted to pH 5.0. To the resultant mixture was added 300 units/g starch of a isoamylase specimen commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and 20 units/g starch of a β -amylase specimen commercialized by Nagase Biochemicals, Kyoto, Japan, and subjected to an enzymatic reaction for 24 hours to obtain an about 92% maltose solution. The resultant solution was heated at 100°C for 20 min, cooled to 50°C, adjusted to pH 7.0, mixed with the maltose-trehalose converting enzyme prepared in the above in an amount of 1.5 units/g dry weight, and subjected to an enzymatic reaction for 72 hours. Thereafter, the resultant culture was heated at 95°C for 10 min, cooled, and, in usual manner, decolored and filtered with an activate charcoal, followed by desalting and purifying the resultant solution with ion exchangers in H- and OH-form. The resultant solution was concentrated to obtain a 70% syrup in a yield of about 95%, d.s.b. The product contains about 64% trehalose, d.s.b., and has a low reducing power of DE 18.0, as well as having a mild sweetness, adequate viscosity and satisfactory moisture-

retaining ability. Because of these it can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, stabilizer, filler, diluent and excipient in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

Example A-13

A syrup obtained by the method in Example A-12 was concentrated into an about 80% syrup which was then placed in a crystallizer, and, similarly as in Example A-8, crystallized and separated to obtain a high-purity hydrous crystalline trehalose in a yield of about 20%, d.s.b. The product exhibits the same physicochemical properties similarly as the product in Experiment 23, and can be arbitrarily used similarly as the product in Example A-8 as an industrial reagent, industrial material and chemical material in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

Example A-14

A seed culture of *Thermus aquaticus* (ATCC 33923) was inoculated in a nutrient culture medium, and cultured similarly as the method in Experiment 15, followed by centrifuging the resultant culture to obtain 50g wet cells having about 1,500 units of a maltose-trehalose converting enzyme activity. The cells were suspended in 100 ml of 2.5% sodium alginate having a viscosity of 300-400 cp, a reagent commercialized by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan. The resultant slurry was continuously dropped into 0.1M CaCl₂ solution, which was stirring by a magnetic stirrer, from the height of about 20 cm above the surface of the solution to form spherical gels having a diameter of about 2 mm. The gels were allowed to stand in the solution at an ambient temperature for about 2

hours, then filtered with a Buchner funnel to obtain cells immobilized with alginate. The immobilized cells were packed in a jacketed-glass column, a diameter of 30 mm and a length of 200 mm, and heated to 60°C. The column was fed with a downstream of 40% maltose solution (pH 6.5) at SV 0.2 to obtain an about 66% trehalose solution which was then in usual manner purified, concentrated and spray dried to obtain a powder trehalose in a yield of about 90%, d.s.b. The powder has a relatively-low reducing power and a mild sweetness, and, similarly as the product in Example A-12, this renders it arbitrarily useful in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

Example B-1

Sweetener

To one part by weight of a hydrous crystalline trehalose powder, obtained by the method in Example A-8, were homogeneously added 0.01 part by weight of "αG SWEET", an α-glycosyl stevioside product commercialized by Toyo Sugar Refining Co., Ltd., Tokyo, Japan, and 0.01 part by weight of "ASPARTAME", a product of L-aspartyl-L-phenylalanine methylester commercialized by Ajinomoto Co., Ltd., Tokyo, Japan, and the resultant mixture was fed to a granulator to obtain a granular sweetener.

The product has a satisfactory sweetness and an about 2.5-fold higher sweetening power of sucrose, as well as having a caloric value as low as about 2/5 of that of sucrose.

Since the product has a satisfactory stability and does not decompose other sweeteners to be mixed, it can be suitably used as a low-caloric sweetener for low-caloric food products for fat persons and diabetics who are restricted to

a reduced calorie intake.

The product does not substantially form acids and insoluble glucans when dental carries-inducing microorganisms act on it, and this renders it useful for sweetening food products to prevent dental carries.

Example B-2

Hard candy

One hundred parts by weight of 55 w/v % sucrose solution was mixed by heating with 30 parts by weight of a trehalose syrup, obtained by the method in Example A-1, and the resultant solution was concentrated *in vacuo* until the moisture content lowered to below 2%. The concentrate was admixed with one part by weight of citric acid and adequate amounts of a lemon flavor and a coloring agent, and the resultant mixture was in usual manner formed into the desired product.

The product is a high-quality hard candy having a satisfactory taste and biting property, as well as having no fear of causing crystallization of sucrose.

Example B-3

Chewing gum

Three parts by weight of a gum base was melted by heating until it softened, and the resultant was mixed with 3 parts by weight of crystalline maltitol and 4 parts by weight of a hydrous crystalline trehalose powder obtained by the method in Example A-3, and further mixed with adequate amounts of a flavor and a coloring agent. The resultant mixture was in usual manner kneaded by a roll, formed and packed to obtain the desired product.

The product is a chewing gum having a satisfactory

texture and taste, and suitably used as a relatively-low or substantially no dental carries-inducing chewing gum.

Example B-4

Powdered juice

Thirty-three parts by weight of a powdered orange juice prepared by spray drying was mixed to homogeneity with 50 parts by weight of a massecuite-type high trehalose content powder obtained by the method in Example A-7, 10 parts by weight of sucrose, 0.65 parts by weight of anhydrous citric acid, 0.1 part by weight of malic acid, 0.1 part by weight of L-ascorbic acid, 0.1 part by weight of sodium citrate, 0.5 parts by weight of pullulan, and an adequate amount of a powdered flavor. The resultant mixture was pulverized and granulated with a fluidized-bed granulator for 30 min to obtain granules while being sprayed with as a binder a trehalose syrup obtained by the method in Example A-6, and ventilated with 40°C air at a flow rate of 150 m³. The granules thus obtained were weighed and packed to obtain the desired product.

The product containing 30% orange juice, d.s.b., retained its high quality for a relatively-long period of time without giving an unsatisfactory taste and smell.

Example B-5

Beverage of lactic acid bacteria

One hundred and seventy-five parts by weight of defatted milk powder, 130 parts by weight of a trehalose syrup obtained by the method in Example A-9, 50 parts by weight of a high lactosucrose powder disclosed in Japanese Patent Laid-Open No.281795/92 were dissolved in 1,150 parts by weight of water, and the solution was sterilized by heating it at 65°C for 30 min, cooled to 40°C, mixed in usual manner with 30 parts

by weight of lactic acid bacteria as a starter, and incubate at 37°C for 8 hours to obtain the desired product with a satisfactory taste and flavor. Since the product contains oligosaccharides, it stably retains the lactic acid bacteria as well as promoting the growth.

Example B-6

Custard cream

One hundred parts by weight of corn starch, 100 parts by weight of a trehalose syrup obtained by the method in Example A-6, 80 parts by weight of maltose, 20 parts by weight of sucrose, and one part by weight of salt were sufficiently mixed. The mixture was admixed with 280 parts by weight of egg, and gradually mixed with 1,000 parts by weight of a boiling milk. The resultant mixture was continued stirring under heating conditions, and the heating was stopped when the corn starch in the mixture was completely gelatinized to show the whole contents semitransparent, followed by cooling the resultant and adding thereto an adequate amount of a vanilla flavor. The resultant mixture was weighed, injected and packed to obtain the desired product.

The product has a smooth surface and gloss as well as a mild taste and sweetness.

Example B-7

"Uiyo-no-moto" (premix of sweet rice jelly)

An uiyo-no-moto was prepared by homogeneously mixing 90 parts by weight of rice powder with 20 parts by weight of corn starch, 40 parts by weight of sucrose, 80 parts by weight of a massecuite-type hydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example A-11, and 4 parts by weight of pullulan.

The product was kneaded with water and an adequate amount of *matcha* (powdered tea), and the resultant mixture was placed in a container and steamed up for 60 min to obtain an *uiro*. The product has a satisfactory gloss, biting property, flavor and taste, as well as having a relatively-long shelf life because the retrogradation of the starch contained therein is well inhibited.

Example B-8

Powdery peptide

One part by weight of "HINUTE S", a peptide solution containing 40% edible soy beans commercialized by Fuji Oil Co., Ltd., Tokyo, Japan, was mixed with 2 parts by weight of a hydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-10, and the resultant mixture was placed in a plastic vessel, dried *in vacuo* at 50°C, and pulverized to obtain a powdery peptide. The product having a satisfactory taste and flavor can be arbitrary used as a material for confectioneries such as premixes, sherbets and ice creams, as well as baby foods and nutrition for therapy in the form of an oral or an intubation feeding.

Example B-9

Powdered miso

To one part by weight of *akamiso* (a kind of *miso*) was added 3 parts by weight of a powdery anhydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example A-4, and the mixture was poured into a metal plate having hemisphere wells on its surface and allowed to stand at an ambient temperature overnight to obtain *miso* solids, about 4 g weight each, which were then subjected to a pulverizer to obtain the desired

product.

The product can be arbitrarily used as a seasoning for instant noodles and soups, as well as a *miso* confectionery.

Example B-10

Powdery egg yolk

Egg yolks prepared from fresh eggs were sterilized at 60-64°C by a plate heater, and one part by weight of the resultant liquid was mixed with 4 parts by weight of a powdery anhydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-4 with respect to one part by weight of the liquid. The resultant mixture was transferred to a vessel, allowed to stand overnight to form a block while the anhydrous crystalline trehalose was allowing to convert into hydrous crystalline trehalose. The block thus obtained was pulverized by a cutter to obtain a powdery egg yolk.

The product can be arbitrarily used as a material for confectioneries for premixes, sherbets, ice creams and emulsifiers, as well as baby foods and nutrition for therapy in the form of an oral or an intubation feeding. The product can be also used as a skin refiner and hair restorer.

Example B-11

An (beans paste)

Ten parts by weight of *adzuki* beans as a material was in usual manner mixed with water and boiled, followed by removing the astringency, harshness of the beans, and water-soluble impurities to obtain about 21 parts by weight of "*adzuki-tsubu-nama-an*". To the resultant were added 14 parts by weight of sucrose, 5 parts by weight of a trehalose syrup obtained by the method in Example A-12, and 5 parts by weight

of water, and the resultant mixture was boiled, mixed with a small amount of salad oil, and carefully kneaded up so as not to paste the beans. Thus, about 35 parts by weight of the desired product was obtained.

The product is free from discoloration induced by boiling and has a satisfactory taste and flavor, and these render it useful as a material of an for bean-jam buns, buns with bean-jam filling, dumplings, bean-jam-filled wafers, sherbets and ice creams.

Example B-12

Bread

One hundred parts by weight of wheat powder, 2 parts by weight of yeast, 5 parts by weight of sugar, one part by weight of a powdery hydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example A-14, 0.1 part by weight of inorganic yeast food were kneaded with water in usual manner, fermented at 26°C for 2 hours, aged for 30 min and baked up.

The product is a high-quality bread having a satisfactory hue and rising, as well as a satisfactory elasticity and mild sweetness.

Example B-13

Ham

To one thousand parts by weight of sliced ham meat were added and ground to homogeneity 15 parts by weight of salt and 3 parts by weight of potassium nitrate, and the ham meat slices were piled up and allowed to stand overnight in a cold-storage room. Thereafter, the resultant slices were first soaked for 7 days in a cold-storage room in a salt solution consisting of 500 parts by weight of water, 100 parts by weight

of salt, 3 parts by weight potassium nitrate, 40 parts by weight of a hydrous crystalline trehalose powder prepared by the method in Example A-3, and an adequate amount of a peppermint, washed with cold water in usual manner, tied up with a string, smoked, cooked, cooled and packed to obtain the desired product.

The product is a high-quality ham having a satisfactory hue, taste and flavor.

Example B-14

Sweetened condensed milk

In 100 parts by weight of a fresh milk as a material were dissolved 3 parts by weight of a trehalose syrup, obtained by the method in Example A-5, and one part by weight of sucrose, and the mixture was sterilized by heating it with a plate heater, condensed into 70% syrup, d.s.b., which was then aseptically caned to obtain the desired product.

Since the product has a mild sweetness and flavor, it can be arbitrarily used as a seasoning for foods for infants and children, fruits, coffee, cocoa and tea.

Example B-15

Cosmetic cream

Two parts by weight of polyoxyethylene glycol monostearate, 5 parts by weight of glyceryl monostearate, self-emulsifying, 2 parts by weight of a massecuite-type high trehalose content powder obtained by the method in Example A-7, one part by weight of α -glycosyl rutin, one part by weight of liquid petrolatum, 10 parts by weight of glyceryl tri-2-ethylhexanoate, and an adequate amount of an antiseptic were in usual manner dissolved by heating. The resultant solution was admixed with 2 parts by weight of L-lactic acid, 5 parts

by weight of 1,3-butylene glycol and 66 parts by weight of refined water, and the resultant mixture was emulsified by a homogenizer and admixed with an adequate amount of a flavor under stirring conditions to obtain a cosmetic cream.

The product having a relatively-high stability can be arbitrarily used as a high-quality sunscreen, skin-refining agent and skin-whitening agent.

Example B-16

Powdery ginseng extract

A half part by weight of ginseng extract was mixed with 1.5 parts by weight of an anhydrous crystalline trehalose powder prepared by the method in Example A-4, and the resultant mixture was transferred to a plain container, allowed to stand for 2 days to convert anhydrous crystalline trehalose into hydrous crystalline trehalose and to form a block, followed by pulverizing the block by a cutter and classifying the resultant into a powdery ginseng extract.

The product and adequate amounts of powdery vitamins B1 and B2 were subjected to a granulator to obtain a powdery ginseng extract containing vitamins.

The product thus obtained can be arbitrarily used as a tonic, fatigue-relieving agent and vitality-imparting agent. The product can be also used as a hair restorer.

Example B-17

Solid pharmaceutical

A natural human interferon- α preparation, produced by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, and commercialized by Cosmo Bio, Tokyo, Japan, was in usual manner fed to a column of an immobilized anti-human interferon- α antibody to adsorb the interferon- α , and a buffer containing

calf serum albumin as a stabilizer was fed to the column, followed by removing an excessive amount of the albumin. Thereafter, the interferon- α was eluted from the column with a physiological saline containing 5% of a high trehalose content powder, prepared by the method in Example A-2, while the pH of the physiological saline was varying. The resultant eluate was membrane filtered, and the filtrate was dehydrated by the addition of about 20-fold volumes of "FINETOSE[®]", an anhydrous crystalline maltose powder commercialized by Hayashibara Shoji, Inc., Okayama, Japan, followed by pulverizing the resultant dehydrated product, and tabletting the resultant powder by a tabletting machine to obtain tablets containing about 150 units of the natural human interferon- α per tablet, about 200 mg weight.

The product can be orally administered as a sublingual tablet to patients at a dose of 1-10 tablets/adult/day, and arbitrarily used to treat viral diseases, allergys, rheumatisms, diabetes and malignant tumors. More particularly, the product can be suitably used as a therapeutic agent for AIDS and hepatitis, the number of patients suffering from these diseases has been remarkably increased. The trehalose and maltose incorporated in the product act as a stabilizer for the natural human interferon- α , so that the activity will be well retained for a relatively-long period of time even at an ambient temperature.

Example B-18

Sugar coated tablet

A crude tablet as a core, 150 mg weight, was coated with a solution consisting of 40 parts by weight of a powdery hydrous crystalline trehalose obtained by the method in Example

A-3, 2 parts by weight of pullulan having an average molecular weight of 200,000, 30 parts by weight of water, 25 parts by weight of talc, and 3 parts by weight of titanium oxide until the total weight reached to about 230 mg, and the resultant was further coated with a solution consisting of 65 parts by weight of a fresh preparation of the same powdery hydrous crystalline trehalose, one part by weight of pullulan, and 34 parts by weight of water, and glossed with a liquid wax to obtain a sugar coated tablet having a satisfactory gloss and appearance.

The product has a relatively-high shock tolerance and retains its high quality for a relatively-long period of time.

Example B-19

Dentifrice

A dentifrice was prepared in usual manner by mixing the following ingredients:

Calcium monohydrogenphosphate	45.0%
Pullulan	2.95%
Sodium lauryl sulfate	1.5%
Glycerine	20.0%
Polyoxyethylene sorbitan laurate	0.5%
Antiseptic	0.05%
Powdery hydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-14	12.0%
Maltitol	5.0%
Water	13.0%

The product is satisfactorily used as a dentifrice for infants because it has an adequate sweetness.

Example B-20

Solid preparation for intubation feeding

A composition consisting of the following compositions was prepared: Five hundred parts by weight of a hydrous crystalline trehalose prepared by the method in Example A-8, 270 parts by weight of powdered egg yolk, 209 parts by weight of defatted milk, 4.4 parts by weight of sodium chloride, 1.8 parts by weight of potassium chloride, 4 parts by weight of magnesium sulfate, 0.01 part by weight of thiamine, 0.1 part by weight of sodium ascorbate, 0.6 parts by weight of vitamin E acetate, and 0.04 parts by weight of nicotinamide. Twenty-five g aliquots of the composition were injected into moisture-proof laminated small bags and heat sealed to obtain the desired product.

One bag of the product is dissolved in about 150-300 ml of water into a fluid food, and orally or parenterally administered to nasal cavity, stomach or intestine by intubation feeding to supplement energy to living bodies.

Example B-21

Hyperalimentation

A high-purity hydrous crystalline trehalose, prepared by the method in Example A-10, was dissolved in water into an about 10 w/v % aqueous trehalose solution which was then in usual manner membrane filtered to remove pyrogen, aseptically injected into a plastic bottle, and sealed to obtain the desired product.

The product, which is a satisfactorily stable hyperalimentation substantially free of change on standing, is suitable for intravenous- and intraperitoneal-administrations. A 10 w/v % solution of the product is isotonic to blood, and this means it can supplement energy to living bodies at 2-fold higher concentration than in the case of glucose.

Example B-22

Hyperalimentation

A high-purity hydrous crystalline trehalose, prepared by the method in Example A-13, and an amino acid composition consisting of the following components were dissolved by stirring in water to give respective concentrations of 5 w/v % and 30 w/v %, and, similarly as in Example B-10 the resultant solution was purified to obtain a pyrogen-free solution, followed by injecting it into a plastic bottle and sealed to obtain the desired product.

Components of amino acid composition

Component	mg/100 ml
L-Isoleucine	180
L-Leucine	410
L-Lysine monohydrochloride	620
L-Methionine	240
L-Phenyl alanine	290
L-Threonine	180
L-Tryptophane	60
L-Valine	200
L-Arginine hydrochloride	270
L-Histidine monohydrochloride	130
Glycine	340

Although the product is a multiple hyperalimentation containing trehalose and amino acids, it is satisfactorily stable without substantial change on standing and can be

suitably administered intravenously and intraperitoneally to living bodies. The product can be arbitrarily used to supplement energy as well as amino acids to living bodies.

Example B-23

Ointment for treating trauma

Two hundred parts by weight of a high trehalose content powder, prepared by the method in Example A-2, and 300 parts by weight of maltose were admixed with 50 parts by weight of methanol solution containing 3 parts by weight of iodine, and the resultant solution was mixed with 200 parts by weight of a 10 w/v % aqueous pullulan solution to obtain the desired product having a satisfactory extensibility and adhesiveness.

The iodine contained in the product exerts a bactericidal activity, and the trehalose in the product acts as an energy-supplementing agent on viable cells, and because of these the product shortens a healing period and satisfactorily heals a wound surface.

[Effect of the Invention]

As is evident from above, the present novel maltose-trehalose converting enzyme converts maltose into trehalose in a satisfactorily-high yield. The present trehalose and saccharide composition containing the same obtained by the present enzymatic reaction have a relatively-high stability and quality as well as a delightful sweetness. They are assimilated, absorbed and used by living bodies as an energy source when orally administered. Therefore, they can be arbitrarily used as a sweetener, taste-improving agent, quality-improving agent, stabilizer, excipient, diluent and

filler in a variety of compositions such as food products, cosmetics and pharmaceuticals.

Thus, the establishment of the present invention is to provide a novel technique to prepare trehalose from maltose which is preparable from starch as a cheap and substantially abundant natural source, and to prepare a saccharide composition containing the trehalose in an industrial-scale and a relatively-low cost. Therefore, the present invention has an unfathomably great influence on the fields such as starch-, enzyme- and biochemical-sciences, and other industrial fields, especially, food-, cosmetic- and pharmaceutical-industries, as well as forestry, fisheries, and agricultural-, livestock- and chemical-industries. Thus, the influence of the present invention on the fields is unfathomably great.

[Explanation of the Accompanying Drawings]

FIG.1 shows the influence of temperature on the enzyme activity of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pimelobacter* sp. R48.

FIG.2 shows the influence of pH on the enzyme activity of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pimelobacter* sp. R48.

FIG.3 shows the influence of temperature on the stability of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pimelobacter* sp. R48.

FIG.4 shows the influence of pH on the stability of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pimelobacter* sp. R48.

FIG.5 shows the influence of temperature on the

enzyme activity of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pseudomonas putida* H262.

FIG.6 shows the influence of pH on the enzyme activity of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pseudomonas putida* H262.

FIG.7 shows the influence of temperature on the stability of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pseudomonas putida* H262.

FIG.8 shows the influence of pH on the stability of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Pseudomonas putida* H262.

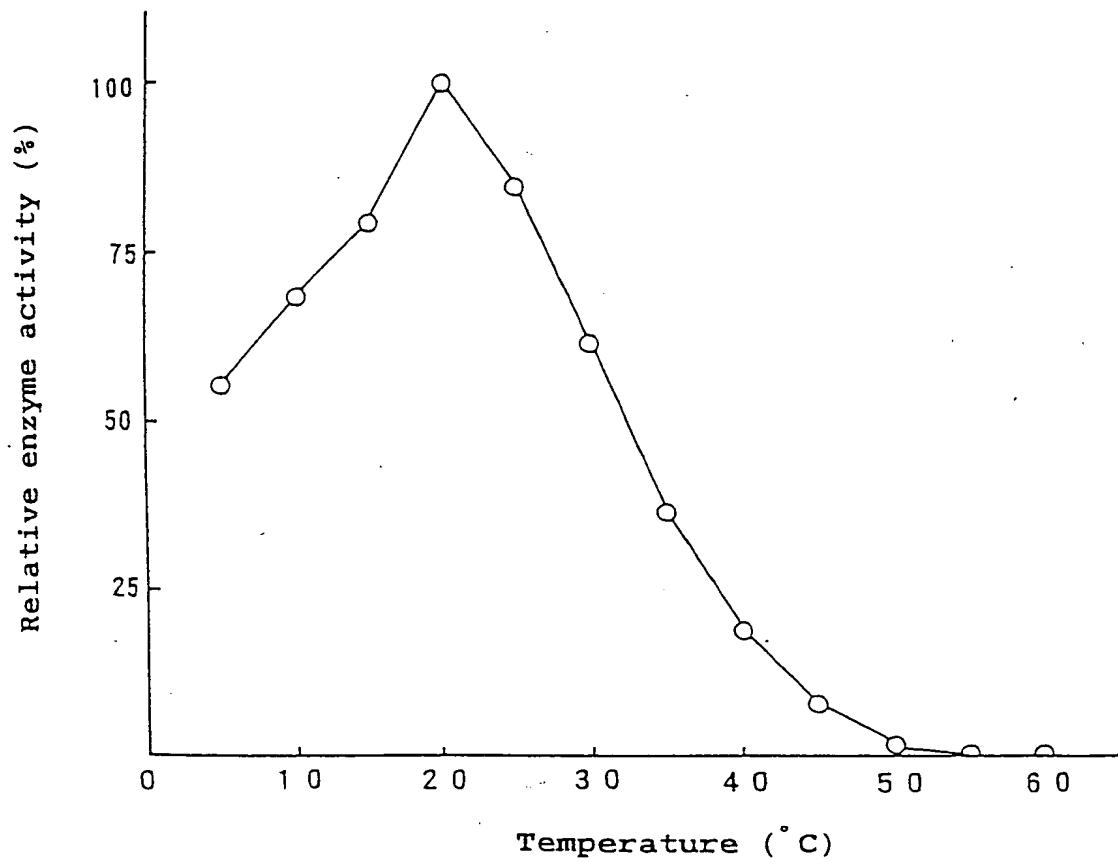
FIG.9 shows the influence of temperature on the enzyme activity of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923).

FIG.10 shows the influence of pH on the enzyme activity of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923).

FIG.11 shows the influence of temperature on the stability of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923).

FIG.12 shows the influence of pH on the stability of the present maltose-trehalose converting enzyme derived from *Thermus aquaticus* (ATCC 33923).

1/12

FIG. 1

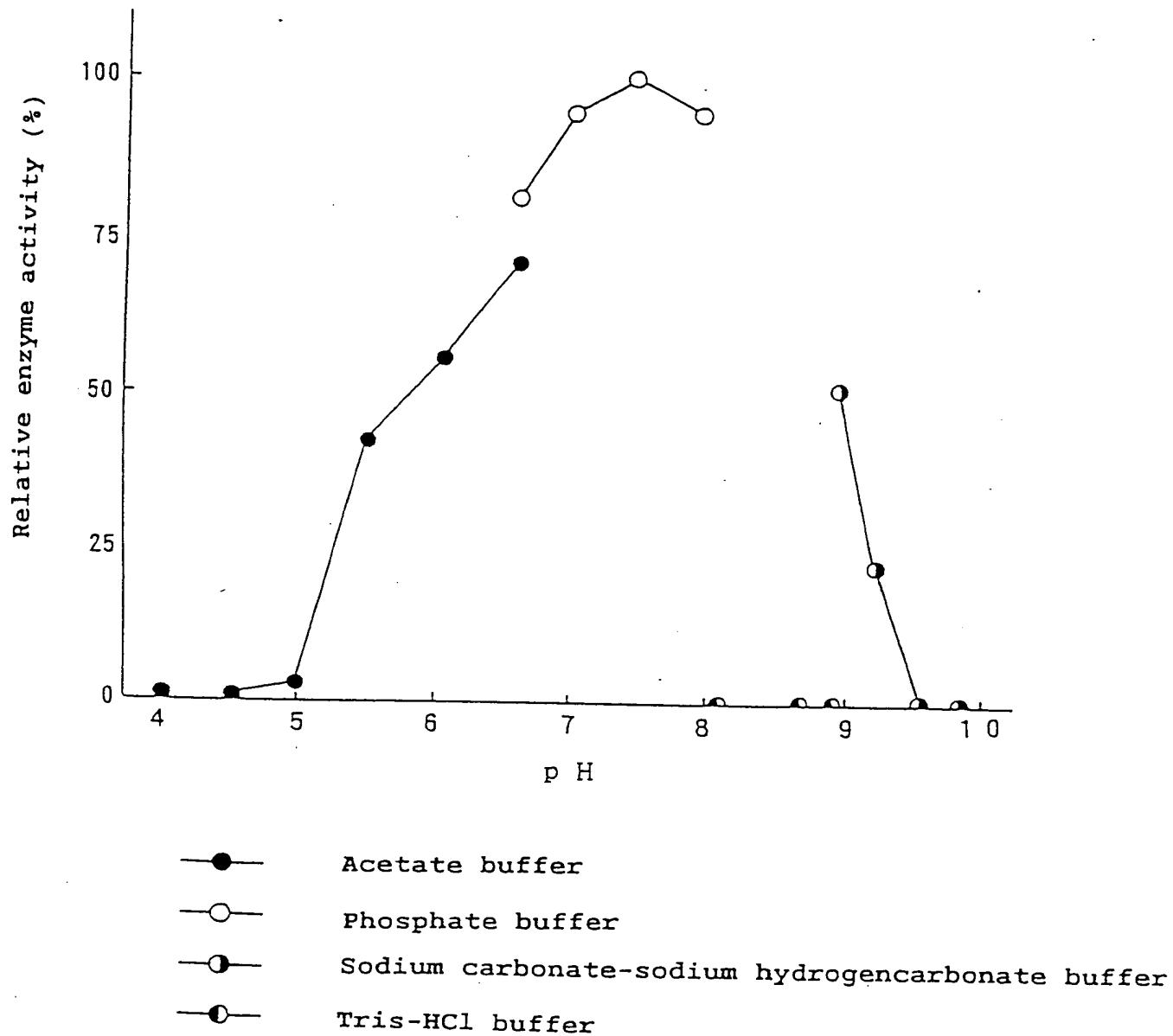


FIG. 2

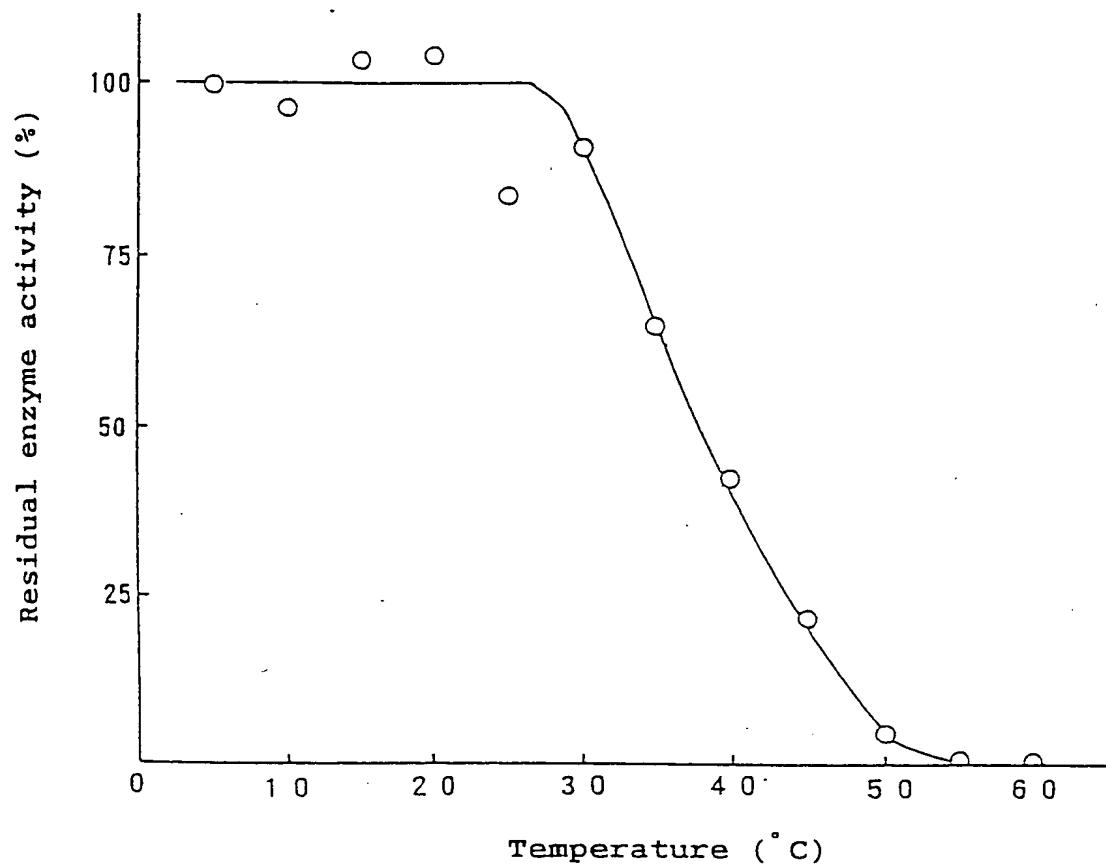


FIG. 3

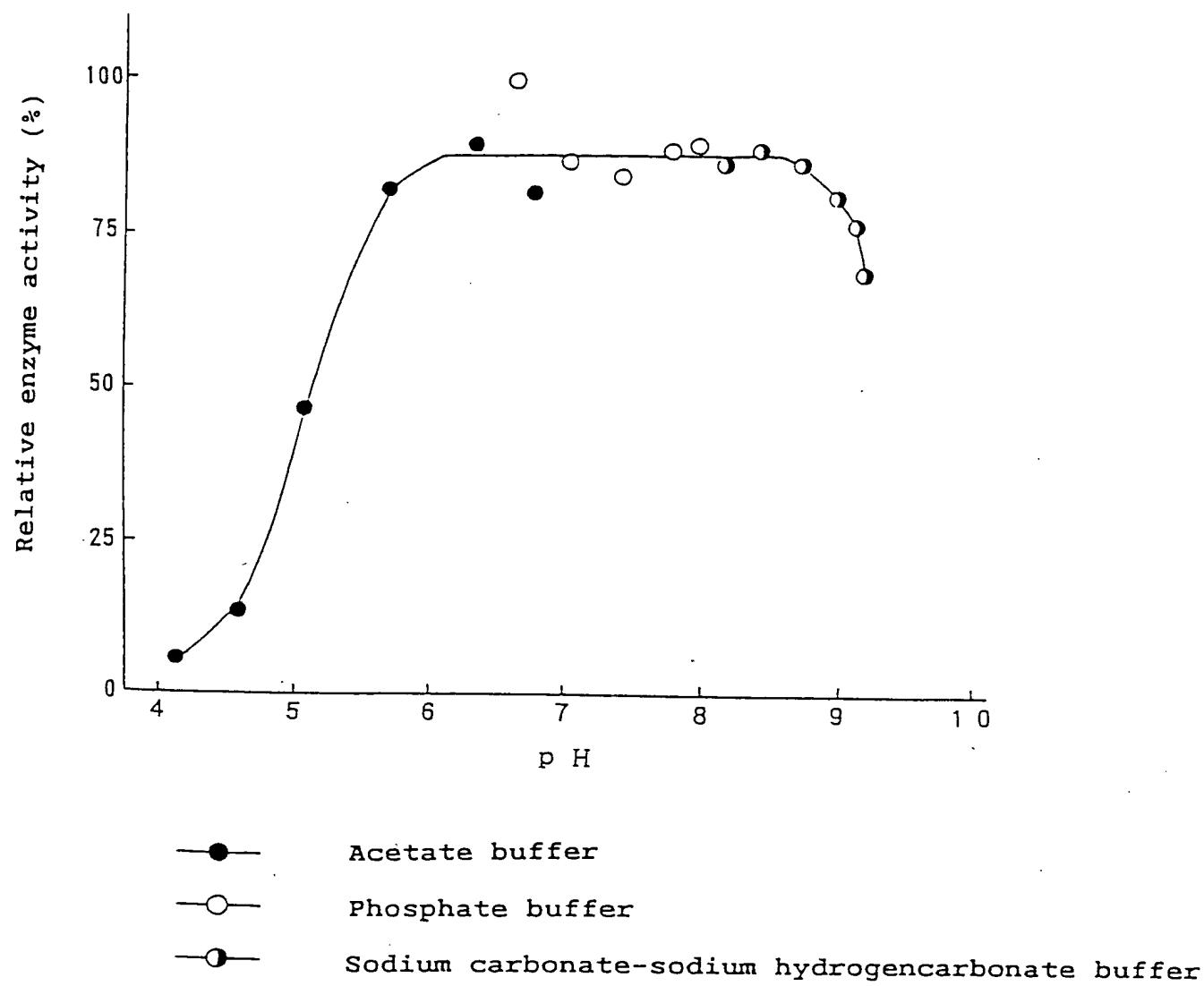


FIG. 4

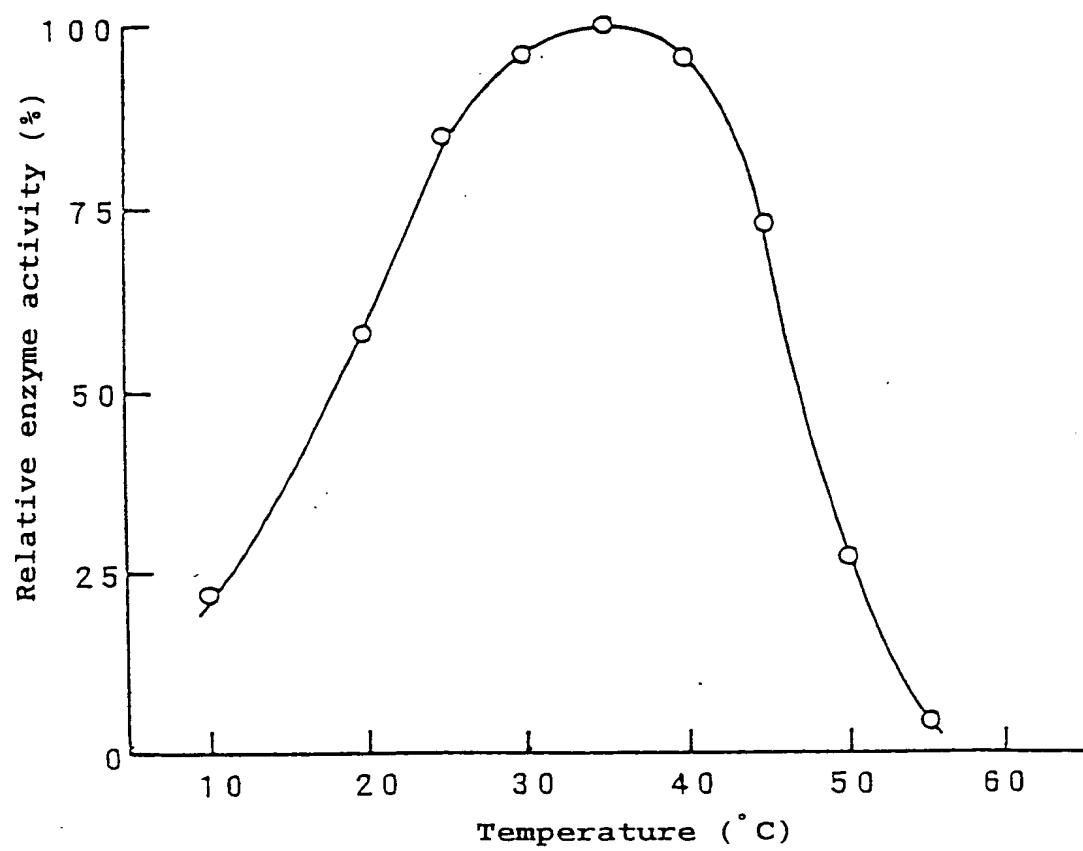


FIG. 5

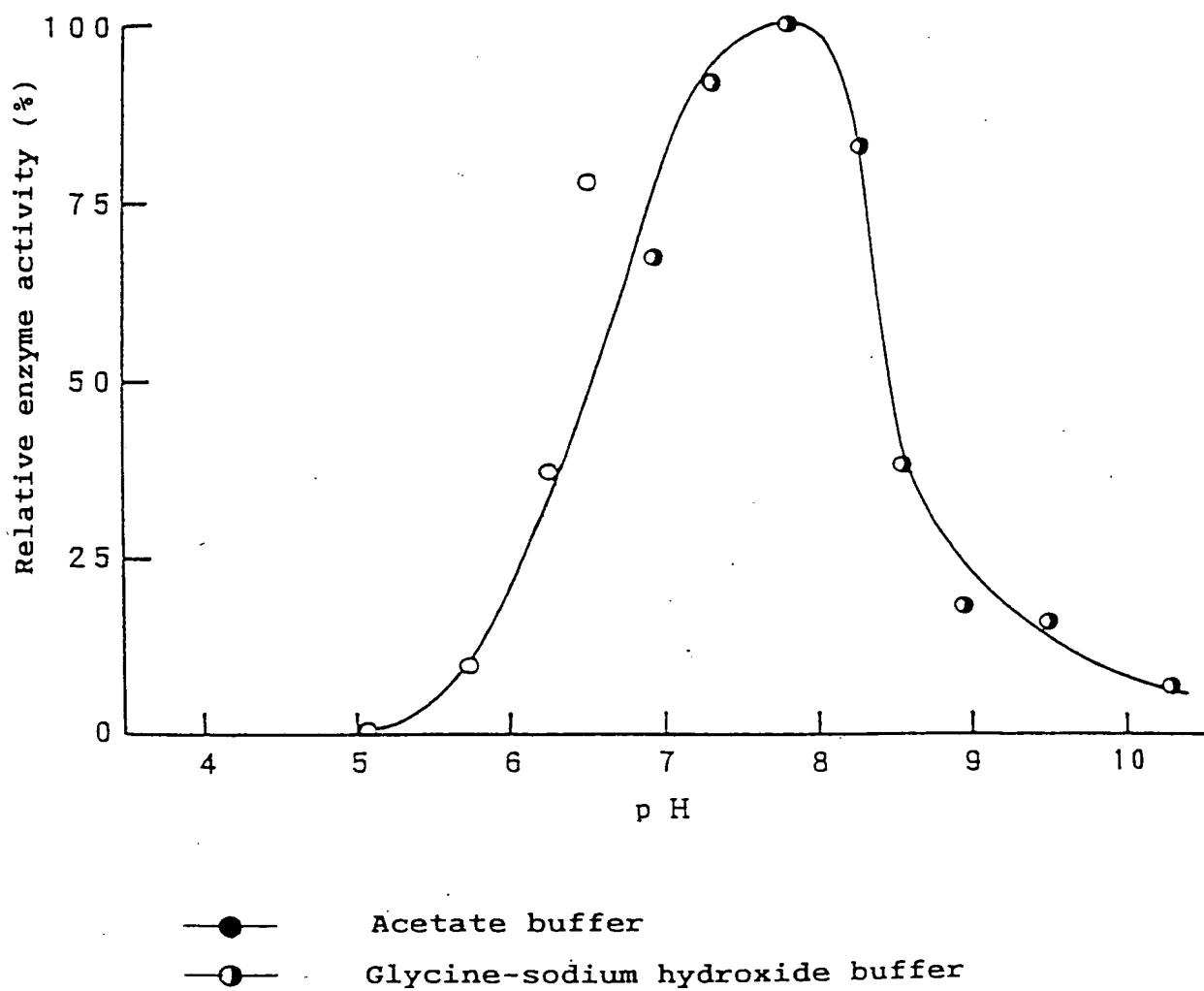


FIG. 6

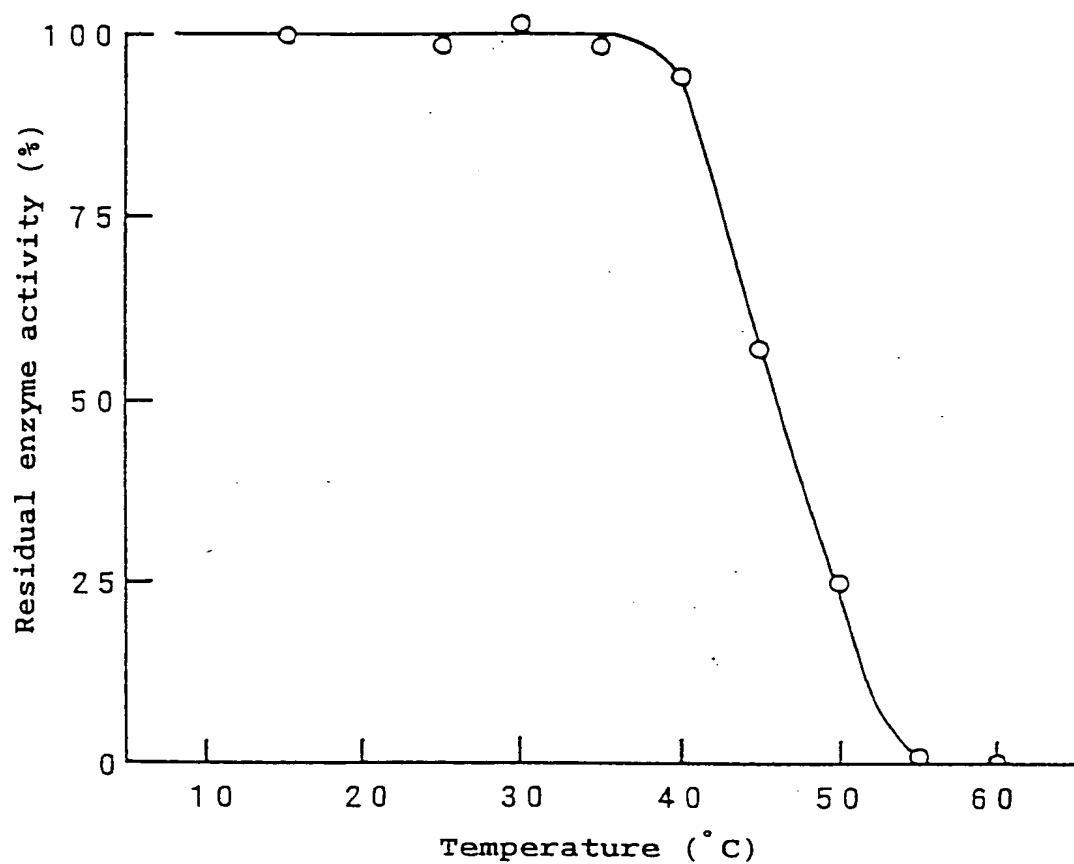


FIG. 7

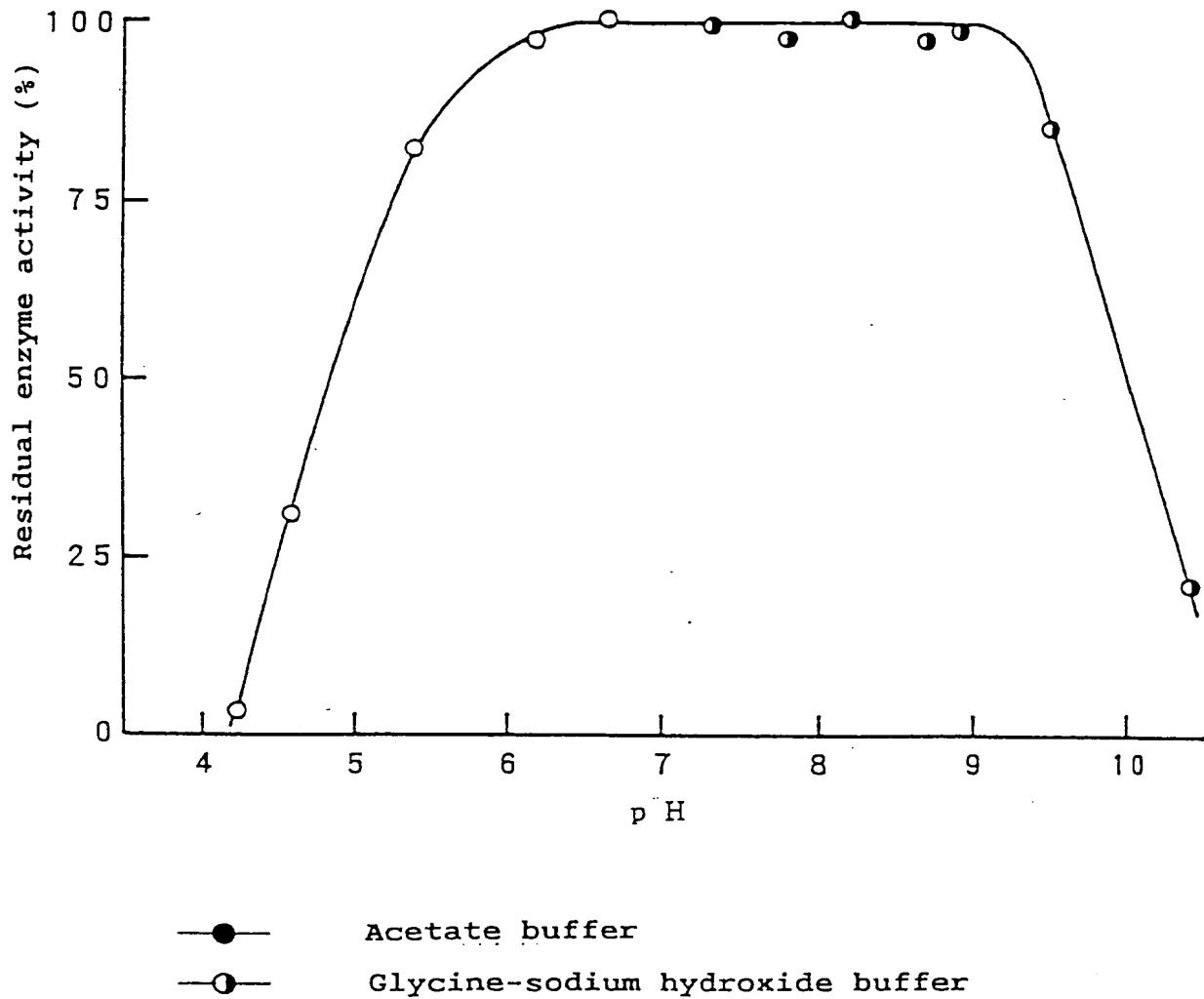


FIG. 8

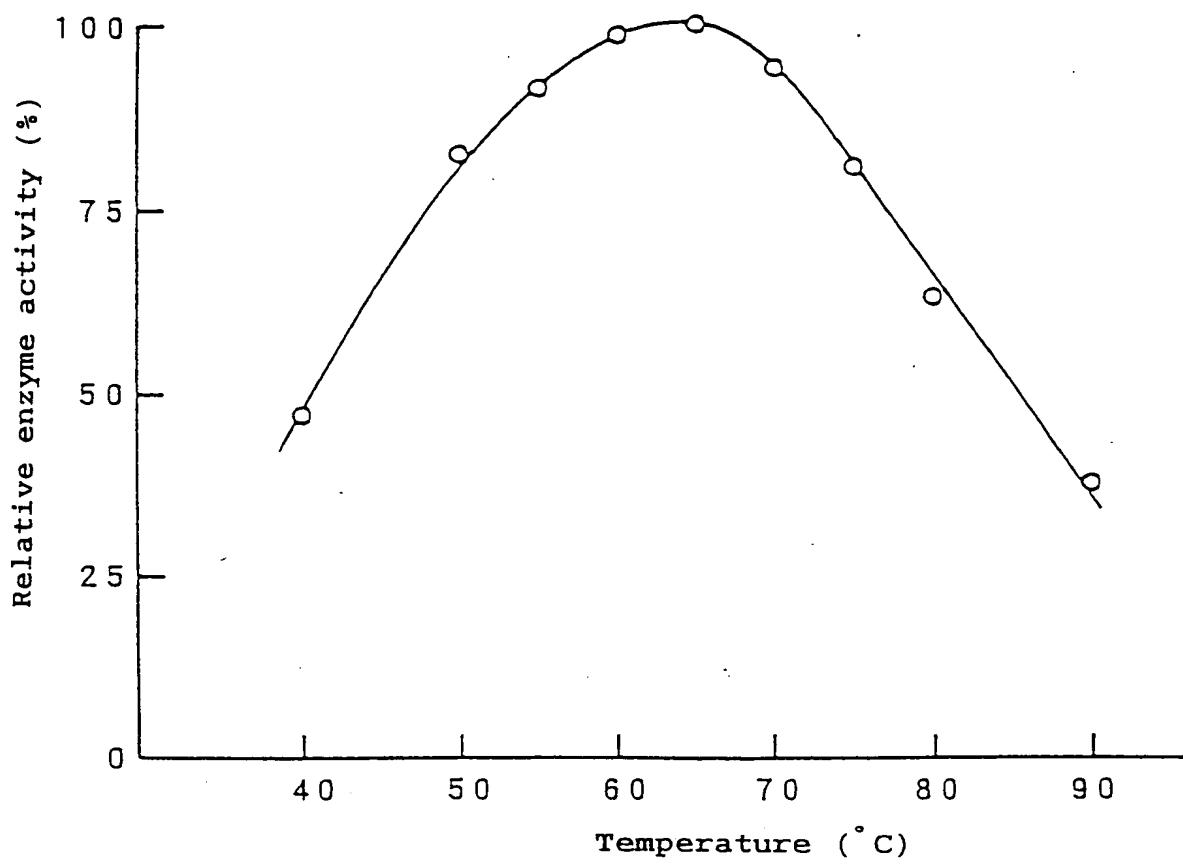


FIG. 9

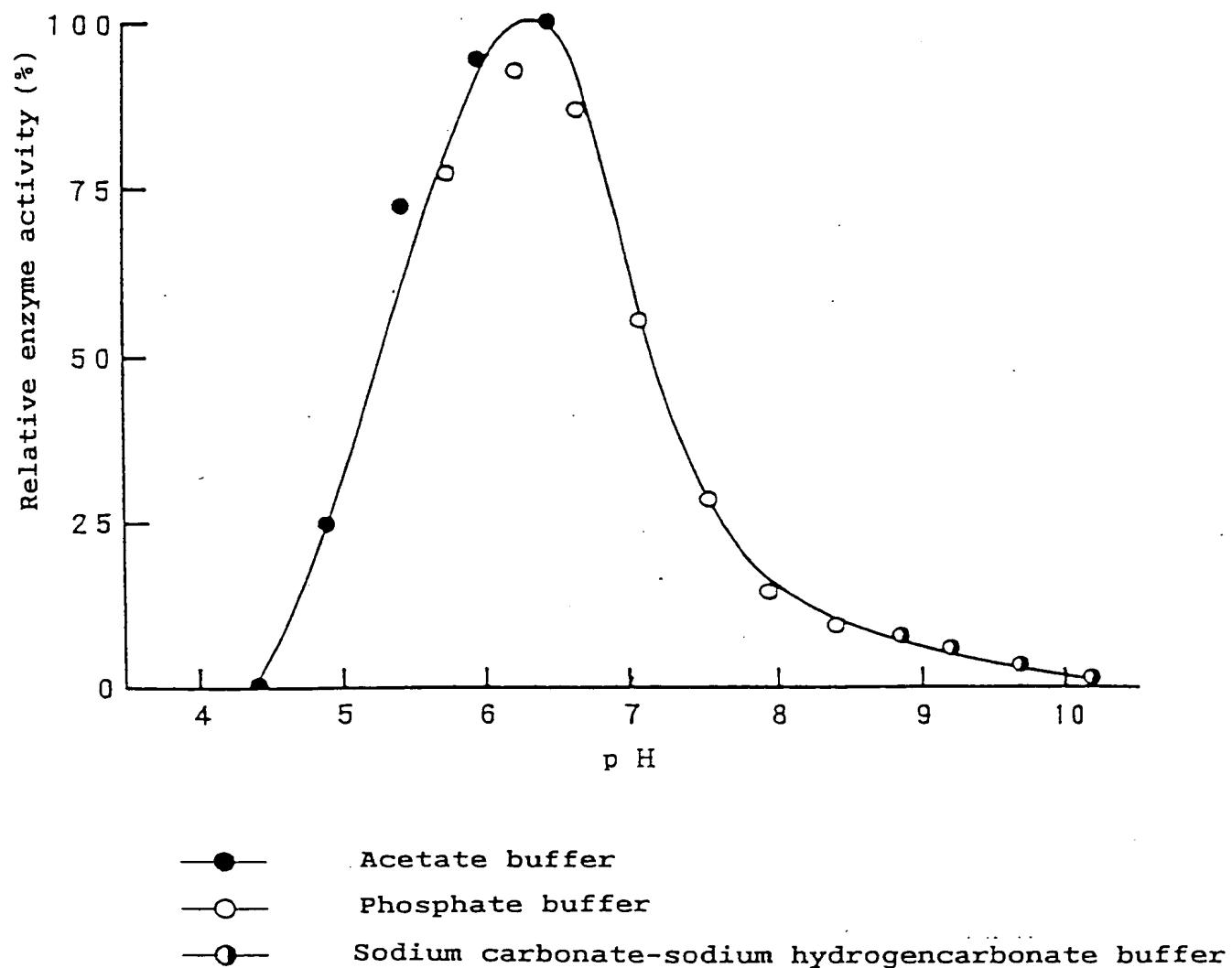


FIG. 10

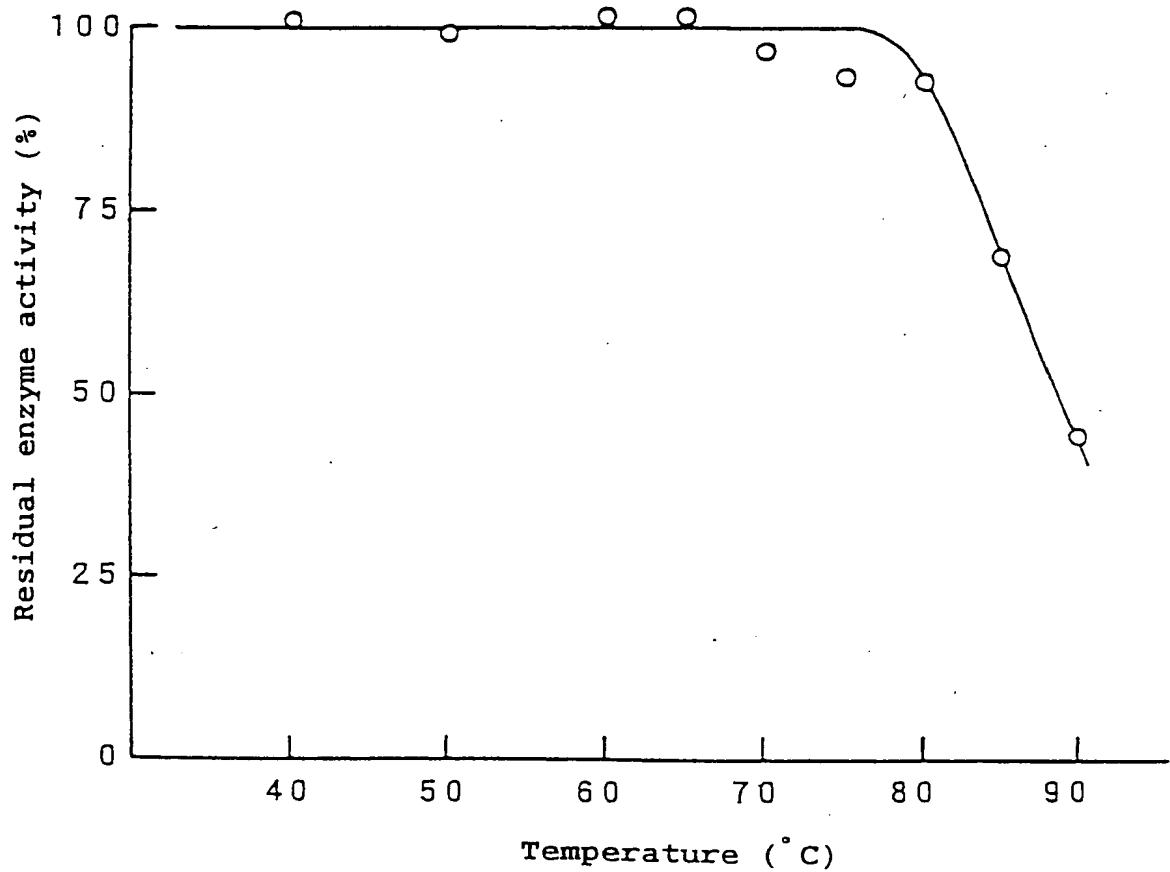


FIG. 11

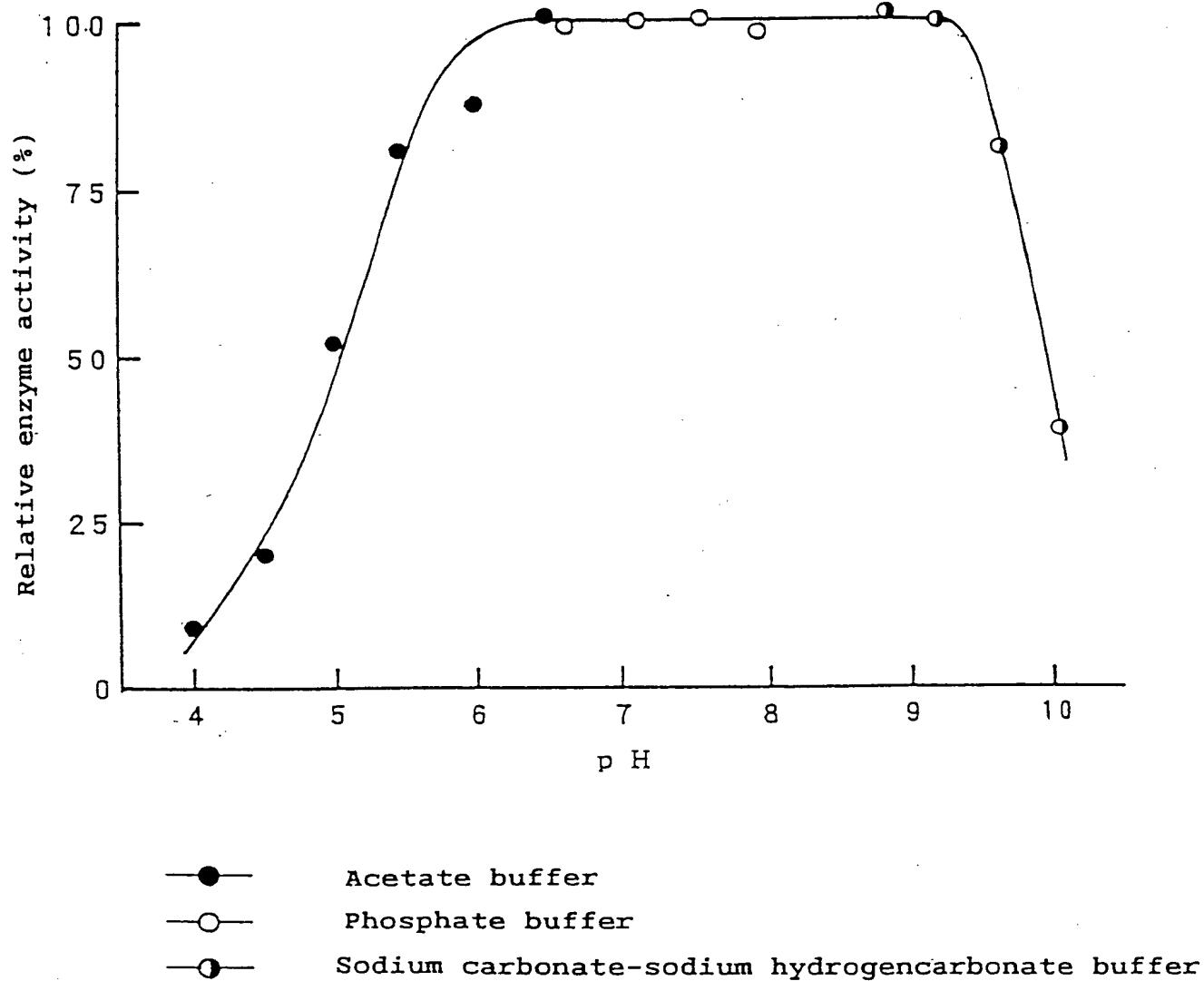


FIG. 12

[Document name] Abstract

[Summary]

[Object] The object of the present invention is to provide a novel maltose-trehalose converting enzyme, preparation of trehalose using the enzyme, and its uses.

[Construction] The present invention is constructed by a maltose-trehalose converting enzyme which converts maltose into trehalose and vice versa, and its preparation; microorganisms which form the enzyme; trehalose prepared from maltose by using the enzyme and saccharide composition containing the trehalose; and compositions containing the trehalose or the saccharide composition.

[Selected figure] Non

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-170977

(43) 公開日 平成7年(1995)7月11日

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C12N 9/10

A21D 2/18

A23C 9/13

9/18

A23G 3/00

105

審査請求 未請求 請求項の数17 FD (全34頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平6-144092

(22) 出願日

平成6年(1994)6月3日

(31) 優先権主張番号 特願平5-199971

(32) 優先日 平5(1993)7月20日

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(72) 発明者 西本 友之

岡山県岡山市桑野525番地の3

(72) 発明者 茶圓 博人

岡山県岡山市湊107番地の2

(72) 発明者 杉本 利行

岡山県岡山市東畦695番44号

(72) 発明者 三宅 俊雄

岡山県岡山市伊島町1丁目3番23号

(54) 【発明の名称】マルトース・トレハロース変換酵素とその製造方法並びに用途

(57) 【要約】

【目的】 マルトースをトレハロースに変換するマルトース・トレハロース変換酵素と該酵素を利用したトレハロースの新規製造方法とその用途を提供する。

【構成】 本発明は、マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換するマルトース・トレハロース変換酵素とその製造方法、それを産生する微生物、並びに、このマルトース・トレハロース変換酵素を用いてマルトースから製造されるトレハロース及びこれを含む糖質、更には、これら糖質を含有せしめた組成物を主な構成とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換するマルトース・トレハロース変換酵素。

【請求項2】 マルトース・トレハロース変換酵素が微生物由来の酵素である請求項1記載のマルトース・トレハロース変換酵素。

【請求項3】 微生物がピメロバクター属、シュードモナス属及びサーマス属から選ばれる微生物である請求項2記載のマルトース・トレハロース変換酵素。

【請求項4】 下記の理化学的性質を有するマルトース・トレハロース変換酵素。

(1) 作用

マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法で、約57,000乃至120,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.8乃至5.1。

(4) 活性阻害

1 mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50 mM トリス塩酸緩衝液で阻害を受ける。

(5) 起源

微生物により産生される酵素である。

【請求項5】 マルトース・トレハロース変換酵素が、ピメロバクター属、シュードモナス属及びサーマス属から選ばれる微生物由来の酵素であって、ピメロバクター属の場合。

(1) 至適温度

pH7.0、60分間反応で、20°C付近

(2) 至適pH

25°C、60分間反応で、pH約7.0乃至8.0

(3) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、30°C付近まで安定

(4) pH安定性

20°C、60分間保持で、pH約6.0乃至9.5の性質を有し、シュードモナス属の場合。

(1) 至適温度

pH7.0、60分間反応で、37°C付近

(2) 至適pH

35°C、60分間反応で、pH約7.3乃至8.3

(3) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、40°C付近まで安定

(4) pH安定性

35°C、60分間保持で、pH約6.0乃至9.5の性質を有し、サーマス属の場合。

(1) 至適温度

pH7.0、60分間反応で、65°C付近

10

(2) 至適pH

60°C、60分間反応で、pH約6.0乃至6.7

(3) 温度安定性

pH7.0、60分間保持で、80°C付近まで安定

(4) pH安定性

60°C、60分間保持で、pH約5.5乃至9.5

の性質を有する請求項4記載のマルトース・トレハロース変換酵素。

10

【請求項6】 マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する作用を有し、部分アミノ酸配列として、

(1) トリプトファン-X₁-アルギニン-X₂-アラニン-X₃-フェニルアラニン(但し、X₁はフェニルアラニン又はプロリンを意味し、X₂はトレオニン又はプロリンを意味し、X₃はバリン又はアラニンを意味する。)

(2) アラニン-バリン-X₄-チロシン(但し、X₄はフェニルアラニン又はイソロイシンを意味する。)から選ばれる部分アミノ酸配列を有するマルトース・トレハロース変換酵素。

20

【請求項7】 マルトース・トレハロース変換酵素産能を有する微生物を栄養培地に培養し、培養物からマルトース・トレハロース変換酵素を採取することを特徴とするマルトース・トレハロース変換酵素の製造方法。

30

【請求項8】 微生物がピメロバクター・スピーシーズ(Pimelobacter sp.) R48(通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号FERM BP-4315)、シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida) H262(通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号FERM BP-4579)及びサーマス・アクアティカス(Thermus aquaticus) ATCC33923から選ばれる微生物である請求項7記載のマルトース・トレハロース変換酵素の製造方法。

30

【請求項9】 ピメロバクター・スピーシーズ(Pimelobacter sp.) R48(通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号FERM BP-4315)又はシュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida) H262(通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、受託番号FERM

40

BP-4579)からなるマルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物。

【請求項10】 マルトース含有溶液にマルトース・トレハロース変換酵素を作用させてマルトースからトレハロースを生成させることを特徴とするマルトースの還元力低減方法。

【請求項11】 マルトース含有溶液にマルトース・トレハロース変換酵素を作用させ、得られるトレハロース、又はこれを含む糖質。

50

【請求項12】 マルトース含有溶液が、澱粉にβ-ア

ミラーゼ又は β -アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させて得られたものである請求項11記載のトレハロース、又はこれを含む糖質。

【請求項13】 トレハロースが、マルトース含有溶液にマルトース・トレハロース変換酵素を作用させるか、又はマルトース含有溶液にマルトース・トレハロース変換酵素を作用させた後にグルコアミラーゼを作用させてトレハロース含有溶液とし、これを塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られる含量を向上させたトレハロースであることを特徴とする請求項11又は12記載のトレハロース。

【請求項14】 トレハロースが、含水結晶又は無水結晶である請求項11、12又は13記載のトレハロース。

【請求項15】 マルトース含有溶液にマルトース・トレハロース変換酵素を作用させて得られるトレハロース、又はこれを含む糖質を含有せしめた組成物。

【請求項16】 組成物が、飲食物、化粧品又は医薬品である請求項15記載の組成物。

【請求項17】 組成物がエネルギー補給用組成物である請求項15又は16記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、マルトース・トレハロース変換酵素とその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する新規マルトース・トレハロース変換酵素とその製造方法、それを產生する微生物、並びに、このマルトース・トレハロース変換酵素を用いて製造されるトレハロース、又はこれを含む糖質、更には、これら糖質を含有せしめた組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、古くからトレハロース(α , α -トレハロース)が知られており、その存在は、『アドバンシズ・イン・カーボハイドレイト・ケミストリー(Advances in Carbohydrate Chemistry)』、第18巻、第201乃至225頁(1963年)アカデミック・プレス社(米国)及び『アプライド・アンド・エンビロメンタル・マイクロバイオロジー(Applied and Environmental Microbiology)』、第56巻、第3213乃至3215頁(1990年)などにも記載されているように、少量ながら、微生物、きのこ、昆虫など広範囲に及んでいる。トレハロースは、非還元性糖質ゆえにアミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起こさず、アミノ酸含有物質を損なわないことから、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待され、その工業的製造方法の確立が望まれている。

【0003】 トレハロースの製造方法としては、例えば、特開昭50-154485公報で報告されている微生物を用いる方法や、特開昭58-216695公報で提案しているマルトース・ホスホリーゼとトレハロース・ホスホリーゼとの組合せでマルトースを変換する方法などが知られている。しかしながら、微生物を用いる方法は、菌体を出発原料とし、これに含まれるトレハロースの含量が、通常、固形物当たり15w/w% (以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w%を%と略称する。) 未満と低く、その上、これを抽出・精製する工程が煩雑で、工業的製造方法としては不適である。また、マルトース・ホスホリーゼ及びトレハロース・ホスホリーゼなどホスホリーゼを用いる方法は、いずれもグルコースリン酸を経由しており、その基質濃度を高めることが困難であり、また、反応系が平衡反応で目的物の生成率が低く、更には、反応系を安定に維持して反応をスムーズに進行させることができない。

【0004】 一方、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し、固形物当たりの還元力の大きさをデキストロース・エクイバント(Dextrose Equivalent, DE)として表している。この値の大きいものは、一般的に、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こしやすく、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質があることが知られている。このような還元性澱粉部分分解物の種々の特性は、DEの大小に依存しており、澱粉部分分解物とDEとの関係は極めて重要である。従来、当業界では、この関係を断ち切ることは不可能とさえ信じられてきた。

【0005】 これに關係して、『月刊フードケミカル』、8月号、第67乃至72頁(1992年)、「澱粉利用開発の現状と課題」の「オリゴ糖」の項において、「トレハロースについては著しく広い応用範囲が考えられるが、本糖の澱粉糖質からの直接糖転移、加水分解反応を用いた酵素的生産は、現在のところ学術的には不可能であるといわれている。」と記載されているように、澱粉を原料とし、酵素反応によってトレハロースを製造することは、従来、学術的にも不可能であると考えられてきた。

【0006】 しかしながら、本発明者等は、当業界のこの常識を覆し、特願平4-362131号明細書及び特願平5-156338号明細書で開示したように、澱粉を原料として製造されるグルコース重合度が3以上の還元性澱粉部分分解物に、その末端にトレハロース構造を有するグルコース重合度が3以上の非還元性糖質を生成

する非還元性糖質生成酵素を作用させて該非還元性糖質を生成せしめ、次いで、これにグルコアミラーゼ、又はトレハロース遊離酵素を作用させることにより、還元性澱粉部分分解物からトレハロースを酵素的に生産することに成功している。しかしながら、この非還元性糖質生成酵素を用いるトレハロース製造方法では、グルコース重合度が3以上の比較的高分子の澱粉糖質を原料とするものであり、その粘度も比較的高く、酵素の種類も2種以上を必要とし、得られる反応物の糖組成も比較的複雑でトレハロース製造におけるコスト高が懸念される。そこで、澱粉から工業的に製造され、安定供給されているグルコース重合度2の澱粉部分分解物、マルトースをトレハロースに変換するトレハロースの新規製造方法の確立が望まれる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、澱粉から工業的に製造され、安定供給されているマルトースをトレハロースに変換するマルトース・トレハロース変換酵素と該酵素を利用したトレハロース、又は、これを含む糖質の新規製造方法並びにその用途を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記課題を解決するためにマルトースからトレハロースを生成する全く新しい変換酵素を求めて、その酵素を產生する微生物を広く検索した。その結果、岡山県岡山市の土壤から分離したピメロバクター (*Pimelobacter*) 属に属する新規な微生物R48、兵庫県西宮市の土壤から分離したシュードモナス属 (*Pseudomonas*) 属に属する新規な微生物H262、並びに公知のサーマス (*Thermus*) 属に属する微生物がマルトースをトレハロースに変換する新規マルトース・トレハロース変換酵素を產生することを見いだし、本酵素をマルトース含有溶液に作用させ得られるトレハロース及びこれを含む糖質の製造方法を確立し、併せて、これら糖質を含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立して本発明を完成した。

【0009】以下、本発明のピメロバクター属に属する微生物R48、並びにシュードモナス属に属する微生物H262の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』(長谷川武治編、学会出版センター、1985年)に準拠して行った。

【0010】

【ピメロバクター・スピーシーズ R48 の同定試験結果】

【A 細胞形態】

(1) 肉汁寒天培養、27°C : 通常、0.5乃至0.9×1.5乃至4.0 μmの桿菌。単独、希にV型の対をなし、連鎖した細胞も観察される。運動性なし。無胞

子。非抗酸性。グラム陽性。

(2) 酵母エキス・麦芽エキス寒天培養、27°C : 培養1日の細胞の大きさは、0.6乃至1.0×1.3乃至4.2 μm、培養3日で0.6乃至1.0×1.0乃至2.5 μmとなり、球菌に近い細胞もみられ、多形性が認められる。また、単独、希にV型の対をなし、連鎖した細胞も観察される。

【0011】

【B 培養的性質】

10	(1) 肉汁寒天平板培養、27°C	
	形状	: 円形 大きさは24時間で0.5 mm。3日で1.5乃至2 mm。
	周縁	: 波状
	隆起	: 半レンズ状
	光沢	: なし
	表面	: しわ状
	色調	: 不透明、クリーム色。

20	(2) 酵母エキス・麦芽エキス寒天平板培養、27°C	
	形状	: 円形 大きさは3日で約1乃至1.5 mm。
	周縁	: 波状
	隆起	: 半レンズ状
	光沢	: なし
	表面	: 粗面
	色調	: 不透明、クリーム色。

30	(3) 肉汁寒天斜面培養、27°C	
	生育度	: 良好
	形状	: 糸状
	(4) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27°C: 液化	

【0012】

【C 生理学的性質】

(1) 硝酸塩の還元性	: 陽性
(2) 脱窒反応	: 陰性
(3) メチルレッド試験	: 陰性
(4) VP試験	: 陰性
(5) インドールの生成	: 陰性
(6) 硫化水素の生成	: 陽性
(7) 淀粉の加水分解	: 陰性
(8) クエン酸の利用	: 陽性
(9) 無機窒素源の利用	: アンモニウム塩及び硝酸塩ともに利用できる。
(10) 色素の生成	: 陰性
(11) ウレアーゼ	: 陰性
(12) オキシダーゼ	: 陰性
(13) カタラーゼ	: 陰性
(14) 生育の範囲	: pH 5乃至9、温度15乃至40°C。
(15) 酸素に対する態度	: 好気性

	利用性	酸生成能
D-グルコース	利用する	陰性
D-ガラクトース	利用しない	陰性
D-マンノース	利用する	陰性
D-フラクトース	利用する	陰性
L-アラビノース	利用する	陰性
D-キシロース	利用する	陰性
L-ラムノース	利用する	陰性
マルトース	利用する	陰性
スクロース	利用する	陰性
ラクトース	利用しない	陰性
トレハロース	利用する	陰性
ラフィノース	利用する	陰性
マンニトール	利用しない	陰性
デキストリン	利用する	陰性
ズルチトール	利用しない	陰性

(17) アミノ酸の脱炭酸試験：L-リジン、L-アルギニン、オルニチン、いずれに対しても陰性。

(18) アミノ酸の利用 : L-グルタミン酸ナトリウム、L-アスパラギン酸ナトリウムいずれも利用する。

(19) DNase : 陰性

(20) 3-ケトラクトースの生成 : 陰性

(21) DNAのG-C含量 : 72%

(22) 細胞壁の主要ジアミノ酸 : LL-ジアミノピメリン酸

【0013】以上の菌学的性質に基づいて、『バージーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、第2巻(1986年)、及び、『ジャーナル・オブ・ジェネラル・アプライド・マイクロバイオロジー (Journal of General Applied Microbiology)』、第29巻、第59乃至71頁、(1983年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、ピメロバクター属に属する菌株で、新規マルトース・トレハロース変換酵素を産生する新規微生物であることが判明した。

【0014】これらの結果から、本発明者等は、本微生物をピメロバクター・スピーザ (Pimelobacter sp.) R48と命名し、平成5年6月3日付で、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託し、受託番号 FERM BP-4315として受託された。

【0015】

【シュードモナス・プチダ H262の同定試験結果】

【A 細胞形態】

(1) 肉汁寒天培養、27°C : 通常 0.5~0.7 × 1.0~2.0 μm の桿菌で胞子は形成しない。極鞭

20

【0016】

【B 培養的性質】

(1) 肉汁寒天平板培養、27°C

形状 : 円形 大きさは24時間で1~2 mm。3日で3.5~4 mm。

周縁 : 全縁

隆起 : 半レンズ状

光沢 : 湿光

表面 : 平滑

色調 : 不透明、白~うすい黄色。

(2) 酵母エキス・麦芽エキス寒天平板培養、27°C

形状 : 円形 大きさは3日で約4~5 mm。

周縁 : 全縁

隆起 : 半レンズ状

光沢 : 湿光

表面 : 平滑

色調 : 不透明、白~クリーム色。

(3) 肉汁寒天斜面培養、27°C

40 生育度

: 良好

形状 : 糸状。隆起は薄く、表面は平滑で湿光、不透明でやや黄味がかったクリーム色。

(4) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27°C : 液化しない

【0017】

【C 生理学的性質】

(1) 硝酸塩の還元性 : 陽性 (コハク酸培地)

(2) 脱窒反応 : 陰性

(3) メチルレッド試験 : 陰性

(4) VP試験 : 陰性

(5) インドールの生成 : 陰性

50

(6) 硫化水素の生成 : 陰性
 (7) 淀粉の加水分解 : 陰性
 (8) ポリ-β-ヒドロキシブチレートの蓄積 : 陰性
 (9) プロカテク酸の分解 : オルト型
 (10) クエン酸の利用 : 陽性
 (11) 無機塩素源の利用 : アンモニウム塩及び硝酸塩ともに利用できる。
 (12) 色素の生成 : うすい黄色の色素生
 (13) 炭素源の利用と酸生成の有無

	利用性	酸生成能
D-グルコース	利用する	陰性
D-ガラクトース	利用しない	陰性
D-マンノース	利用する	陽性
D-フラクトース	利用する	陽性
L-アラビノース	利用する	陽性
D-キシロース	利用する	陽性
L-ラムノース	利用しない	陰性
マルトース	利用しない	陰性
スクロース	利用しない	陰性
ラクトース	利用しない	陰性
トレハロース	利用しない	陰性
ラフィノース	利用しない	陰性
マンニトール	利用しない	陰性
ソルビトール	利用しない	陰性
ズルチトール	利用しない	陰性
グリセロール	利用する	陽性

(20) アミノ酸の脱炭酸試験 : L-リジン、L-オルニチンに対して陰性。L-アルギニンに対して陽性。
 (21) アミノ酸の利用 : L-グルタミン酸ナトリウム、L-アスパラギン酸ナトリウム、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-バリン、D-アラニンいずれも利用する。L-トリプトファンを利用しない。

(22) DNase : 陰性 (23) 3-ケトラクトースの生成: 陰性

(24) DNAのG-C含量 : 63%

【0018】以上の菌学的性質に基づいて、『バージーズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergery's Manual of Systematic Bacteriology)』、第1巻(1984年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、シュードモナス・プチダに属する菌株であることが判明した。

【0019】これらの結果から本発明者らは、本微生物をシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) H262と命名し、平成6年2月23日付で、茨城県つくば市東1丁目1番3号にある通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターに寄託し、受託番号、FERM BP-4579として受託された。

【0020】本発明では、上記菌株のみならず、ピメロ

(13) 蛍光性色素の生成 : 陽性
 (14) ウレアーゼ : 陽性
 (15) オキシダーゼ : 陽性
 (16) カタラーゼ : 陽性
 (17) 生育の範囲 : pH 5乃至9、温度10乃至37°C。
 (18) 酸素に対する態度 : 好気性

【0021】また、本発明に用いられる微生物としては、前記の新規微生物だけでなく、公知のサーマス (*Thermus*) 属に属する微生物、例えば、サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) ATCC 25104、サーマス・アクアティカス ATCC 27634、サーマス・アクアティカス ATCC 33923、サーマス・フィリホルミス (*Thermus filiformis*) ATCC 43280、サーマス・ルーバー (*Thermus ruber*) ATCC 35948、サーマス・スピーシーズ (*Thermus sp.*) ATCC 43814、及びサーマス・スピーシーズ ATCC 43815なども有利に利用できる。

【0022】本発明の微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、本発明の酵素を産生するものであればよく、合成培地及び天然培地のいずれでもよい。炭素源としては、微生物が資化できる物であればよく、例えば、グルコース、フラクトース、糖蜜、トレハロース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、澱粉部分分解物などの糖質、また、クエン酸、コハク酸などの有機酸又はそれらの塩なども使用することが

できる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適宜選択される。例えば、培養液のグルコースの濃度は、40w/v%以下が望ましく、微生物の生育及び増殖からは10w/v%以下が好ましい。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物及び、例えば、尿素、コーン・スティープ・リカーカゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。

【0023】培養は、微生物が生育し、本発明の酵素を産生する温度が適しており、通常、温度約4乃至80°C、好ましくは約20乃至75°C、pH約5乃至9、好ましくはpH約6乃至8.5から選ばれる条件で、好気的に行われる。培養時間は微生物が増殖し得る時間であればよく、好ましくは約10乃至100時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、約0.5乃至20ppmが好ましい。そのために、通気量を調節したり、攪拌したり、酸素を使用したり、また、培養槽内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養又は連続培養のいずれでもよい。

【0024】このようにして、微生物を培養した後、得られる培養物から本発明の酵素を回収する。本酵素活性は、培養物の菌体外培養液及び菌体のいずれにも認められ、菌体外培養液及び菌体を粗酵素として回収すればよく、また、培養物全体を粗酵素として用いることもできる。菌体外培養液と菌体との分離には通常の固液分離手段が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する手段、培養物に濾過助剤を加えたり、あるいは、プレコートすることにより濾過分離する手段、平膜、中空糸膜などを用いる膜濾過分離する手段などを適用し得る。菌体外培養液をそのまま粗酵素液として用いることができるが、好ましくは通常の手段で濃縮する。例えば、硫酸塩析法、アセトン及びアルコール沈殿法、平膜、中空糸膜などを用いる膜濃縮法などが採用される。

【0025】菌体内酵素は、通常の手段を用いて菌体から抽出し、粗酵素液として用いることができる。例えば、超音波による破碎法、ガラスビーズ及びアルミナによる機械的破碎法、フレンチプレスによる破碎法などで菌体から酵素を抽出し、遠心分離又は膜濾過などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【0026】更に、菌体外培養液及びその濃縮物又は菌体抽出液は、通常の手段で固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包括法などが採用される。また、培養物から分離した菌体をそのまま粗酵

素として用いることができるが、固定化菌体として用いてもよい。一例として、これをアルギン酸ナトリウムと混合して、塩化カルシウム溶液中に滴下して粒状にゲル化させる。この粒状化菌体をさらにポリエチレンイミン、グルタルアルデヒドで処理した固定化酵素として用いてもよい。

【0027】粗酵素はそのまま用いてもよいが、通常の手段によって精製することもできる。一例として、菌体破碎抽出液を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析

10 後、DEAE-トヨパール樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、ブチルトヨパール樹脂を用いた疎水カラムクロマトグラフィー、モノQ HR5/5樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、トヨパールHW-55樹脂を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーなどを組合せて電気泳動的に単一な酵素を得ることができる。

【0028】このようにして得られるマルトース・トレハロース変換酵素は、下記の理化学的性質を有する。

(1) 作用

20 マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法で、約57,000乃至120,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.8乃至5.1。

(4) 活性阻害

30 1 mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50 mM トリス塩酸緩衝液で阻害を受ける。

(5) 起源

微生物により產生された酵素である。

【0029】由来微生物の違いによる具体例を示せば次の通りである。

【ピメロバクター・スピーシーズ R48由来のマルトース・トレハロース変換酵素】

(1) 作用

40 マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。1モルのマルトース又はトレハロースからそれぞれ約1モルのトレハロース又はマルトースを生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法で、約57,000乃至67,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法で、pI約4.1乃至5.1。

(4) 活性阻害

1 mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50 mM トリス塩酸緩衝液で阻害を受ける。

(5) 至適温度
pH 7.0、60分間反応で、20°C付近。

(6) 至適pH
25°C、60分間反応で、約7.0乃至8.0。

(7) 温度安定性
pH 7.0、60分間保持で、30°C付近まで安定。

(8) pH安定性
20°C、60分間保持で、約6.0乃至9.0。

【0030】

【シュードモナス・プチダ H262由来のマルトース
・トレハロース変換酵素】

(1) 作用
マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。1モルのマルトース又はトレハロースからそれぞれ約1モルのトレハロース又はマルトースを生成する。

(2) 分子量
SDS-ゲル電気泳動法で、約110,000乃至120,000ダルトン。

(3) 等電点
アンフォライン含有電気泳動法で、pI約4.1乃至5.1。

(4) 活性阻害
1mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50mMトリス塩酸緩衝液で阻害を受ける。

(5) 至適温度
pH 7.0、60分間反応で、37°C付近。

(6) 至適pH
35°C、60分間反応で、約7.3乃至8.3。

(7) 温度安定性
pH 7.0、60分間保持で、40°C付近まで安定。

(8) pH安定性
35°C、60分間保持で、約6.0乃至9.5。

【0031】

【サーマス・アクアティカス ATCC33923由来のマルトース・トレハロース変換酵素】

(1) 作用
マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。1モルのマルトース又はトレハロースからそれぞれ約1モルのトレハロース又はマルトースを生成する。

(2) 分子量
SDS-ゲル電気泳動法で、約100,000乃至110,000ダルトン。

(3) 等電点
アンフォライン含有電気泳動法で、pI約3.8乃至4.8。

(4) 活性阻害
1mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50mMトリス塩酸緩衝液で阻害を受ける。

(5) 至適温度
pH 7.0、60分間反応で、65°C付近。

(6) 至適pH
60°C、60分間反応で、約6.0乃至6.7。

(7) 温度安定性
pH 7.0、60分間保持で、80°C付近まで安定。

(8) pH安定性
60°C、60分間保持で、約5.5乃至9.5。

【0032】本発明のマルトース・トレハロース変換酵素の活性は次のようにして測定する。基質としてマルトース20w/v% (10mMリン酸塩緩衝液、pH 7.0) 1mLに酵素液1mLを加え、反応温度を25°C、35°Cあるいは60°Cとし、60分間反応させた後、100°Cで10分間加熱して反応を停止させる。この反応液を正確に50mMリン酸塩緩衝液pH 7.5で1倍に希釈し、その希釈液0.4mLにトレハラーゼ含有溶液(1単位/mL)を0.1mL添加したものを45°C、120分間インキュベートした後、この反応液中のグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量する。

20 対照として、予め100°Cで10分間加熱することにより失活させた酵素液及びトレハラーゼを用いて同様に測定する。上記の測定方法を用いて、増加するグルコース量からマルトース・トレハロース変換酵素により生成するトレハロース量を求め、その活性1単位は、1分間に1μmolのトレハロースを生成する酵素量と定義する。

【0033】なお、反応温度は、マルトース・トレハロース変換酵素が、ピメロバクター属に属する微生物由来の場合に25°Cとし、シュードモナス属に属する微生物由来の場合に35°Cとし、サーマス属に属する微生物由来の場合に60°Cとした。

30 【0034】本発明のマルトース・トレハロース変換酵素は、マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換できるので、基質は目的に適うものを選べばよい。トレハロースを製造しようとする目的のためには、マルトースを基質にすればよい。

【0035】マルトースとしては、本発明のマルトース・トレハロース変換酵素が作用してトレハロースを生成するものであればよく、一般的には、できるだけ高純度の、望ましくは純度70%以上のマルトース高含有物が用いられる。市販のマルトースを用いることも、また、常法に従って、澱粉を糖化して調製したマルトースを用いることも有利に実施できる。

40 【0036】マルトースを澱粉から調製する方法としては、例えば、特公昭56-11437号公報、特公昭56-17078号公報などに開示されている糊化又は液化澱粉にβ-アミラーゼを作用させ、生成するマルトースを高分子デキストリンから分離し、マルトース高含有物を採取する方法、又は、例えば、特公昭47-13050号公報、特公昭54-3938号公報に開示されて

いる糊化、又は液化澱粉にβ-アミラーゼとともにイソアミラーゼ、プルラナーゼなどの澱粉枝切酵素を作用させてマルトース高含有物を採取する方法などがある。

【0037】更に、これら方法で得られるマルトース高含有物に含まれるマルトトリオースなどの夾雜糖類に、例えば、特公昭56-28153号公報、特公昭57-3356号公報、特公昭56-28154号公報などに開示されている酵素を作用させてマルトース含量を高めるか、更には、例えば、特開昭58-23799号公報などに開示されている塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより、夾雜糖類を除去するなどの方法によりマルトース含量を更に高めることも好都合である。

【0038】本発明の基質濃度は特に限定されない。例えば、基質溶液としてマルトースを0.1%で用いた場合でも、5.0%で用いた場合でも、本酵素の反応は進行し、トレハロースを生成する。また、基質溶液中に完全に溶けきれない基質を含有する高濃度溶液であってもよい。反応温度は酵素が失活しない温度、すなわち80°C付近までで行えばよいが、好ましくは約0乃至70°Cの範囲を用いる。反応pHは、通常、約5.5乃至9.0の範囲に調整すればよいが、好ましくはpH約6.0乃至8.5の範囲に調整する。反応時間は、酵素反応の進行具合により適宜選択すればよく、通常、基質固形物グラム当たり約0.1乃至100単位の酵素使用量で0.1乃至100時間程度である。

【0039】このようにして得られる反応液は、基質マルトースからのトレハロースへの変換率が高く、最大で約70乃至85%にも達することが判明した。

【0040】反応液は、常法により、濾過、遠心分離などして不溶物を除去した後、活性炭で脱色、H型、OH型イオン交換樹脂で脱塩し、濃縮し、シラップ状製品とすることも、乾燥して粉末状製品にすることも、更には結晶製品にすることも随意である。

【0041】必要ならば、更に、高度な精製をすることも随意である。例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分画、活性炭カラムクロマトグラフィーによる分画、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画、アルカリ処理による還元性糖質の分解除去などの方法で精製することにより、高純度のトレハロース製品を得ることも容易である。また、カラムクロマトグラフィーなどにより分離し得られるマルトースを、再び、本発明のマルトース・トレハロース変換酵素の基質に用いてトレハロースへの変換反応を行うことも有利に実施できる。

【0042】このようにして得られた本発明のトレハロース含有糖質を、必要により、グルコアミラーゼ、α-グルコシダーゼなどで加水分解したり、澱粉部分分解物などを加え、シクロマルトデキストリン・グルカノトランスクフェラーゼやグルコシルトランスクフェラーゼなどで

糖転移したりして、甘味性、還元力、粘性などを調整することも、また、アルカリ処理して還元性糖質を分解除去したり、酵母により還元性糖質を発酵除去すること、更には、水素添加して還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。これを、前述の精製方法、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取し、これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させてトレハロース含水結晶又は無水結晶トレハロースを得ることも有利に実施できる。

【0043】イオン交換カラムクロマトグラフィーとしては、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより、夾雜糖類を除去してトレハロース高含有画分を採取する方法が有利に実施できる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0044】トレハロース含水結晶を製造するには、例えば、純度60%以上、濃度6.5乃至9.0%のトレハロース含有液を助晶機にとり、必要に応じて、約0.1乃至20%の種晶共存下で、温度9.5°C以下、望ましくは、10乃至90°Cの範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスケットを製造する。また、減圧濃縮しながら晶析させる連続晶析法を採用することも有利に実施できる。マスケットからトレハロース含水結晶又はこれを含有する含蜜結晶を製造する方法

30 は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【0045】分蜜方法の場合には、通常、マスケットをバスケット型遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜（母液）とを分離し、必要により、該結晶に少量の冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。

【0046】噴霧乾燥方法の場合には、通常、濃度約6.0乃至8.5%、晶出率20乃至60%程度のマスケットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、約60乃至100°Cの熱風で乾燥し、次いで30乃至60°C程度の温風で約1乃至20時間熟成すれば非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【0047】また、ブロック粉碎方法の場合には、通常、水分約1.0乃至2.5%、晶出率1.0乃至6.0%程度のマスケットを数時間乃至3日間程度静置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎又は切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【0048】また、無水結晶トレハロースを製造するには、トレハロース含水結晶を乾燥して変換生成させることもできるが、一般的には、水分10%未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶機にとり、種晶共存下で50乃至160℃、望ましくは80乃至140℃の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的高温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法、押し出し造粒方法などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【0049】このようにして製造される本発明のトレハロースは、還元力がなく、安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸又はアミノ基を含有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することも、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、それ自身が良質で上品な甘味を有している。更に、トレハロースは、体内のトレハラーゼにより容易にグルコースに分解されることから、経口摂取した場合、容易に消化吸収され、カロリー源として利用される。また、虫歯誘発菌などによって、酵酛されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用できる。

【0050】また、安定な甘味料であることより、結晶製品の場合には、フルラン、ヒドロキシエチルスター、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤として利用することも有利に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他糖の晶出防止性、難酵酛性、澱粉の老化防止性などの性質も具備している。

【0051】従って、本発明のトレハロース及びこれを含む糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして飲食物、嗜好物、飼料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0052】本発明のトレハロース及びこれを含む糖質は、そのまま甘味付けのための調味料として使用することができる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メイプルシュガー、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 α -グリコシルステビオシド、レバウディオシド、グリチルリチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種又は2種以上の適量と混合して使用してもよく、また必要ならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような增量剤と混合して使用することもできる。

【0053】また、本発明のトレハロース及びこれを含む糖質の粉末乃至結晶状製品は、そのまで、又は必要に応じて、增量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

【0054】また、本発明のトレハロース及びこれを含

む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0055】例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麺つゆ、ソース、ケチャップ、たくあん漬の素、白菜漬の素、焼肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

【0056】また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、ショーフィー、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、キャンデーなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきするめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつくだ煮類、煮豆、ポテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、乳飲料、ヨーグルト、チーズなどの乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のビン詰、缶詰類、清酒、合成酒、リキュール、洋酒などの酒類、紅茶、コーヒー、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤などの各種飲食物への甘味付けに呈味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0057】また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、餌料などの嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、更には、品質改良剤として有利に利用できる。

【0058】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健

康

康食品、医薬品などに有利に適応できる。例えば、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター- α 、ツモア・ネクロシス・ファクター- β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキン2などのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモン、胎盤ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生素質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カルチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン含有液、リパーゼ、エラスターーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ロイヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の健康新品や医薬品などを容易に製造できる。

【0059】以上述べたような各種組成物にトレハロース及びこれを含む糖質を含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程で含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常、0.1%以上、望ましくは、1%以上含有せしめるのが好適である。次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0060】

【実験1 酵素の生産】グルコース2.0w/v%、オリベプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%、炭酸カルシウム0.5w/v%、及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで115°C、30分間滅菌し、冷却して、ピメロバクター・スピーシーズ R48 (FERM BP-4315) を接種し、27°C、200rpmで24時間回転振盪培養したものを種培養とした。

【0061】容量30lのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度27°Cとした後、種培養液1v/v%を接種し、温度27°C、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、約40

時間通気攪拌培養した。

【0062】培養液のマルトース・トレハロース変換酵素活性は、0.55単位/m1であった。培養液の一部を採り、遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリン酸塩緩衝液(pH7.0)に懸濁し、元の培養液と同じ液量とした後、菌体懸濁液と培養液上清のマルトース・トレハロース変換酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、0.5単位/m1の活性が、培養液上清には、0.05単位/m1の活性が認められた。なお、本酵素の活性は、反応温度を25°Cにして測定した。

【0063】

【実験2 酵素の精製】実験1で得た培養液を遠心分離して湿重量約0.5kgの菌体を回収し、これを10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した。この菌体懸濁液約5lをヴィブローゲン セルミル(エドモンドビューラー社製)にかけ、菌体を破碎し、この破碎処理液を遠心分離(15,000G、30分間)することにより、約4.5lの上清を得た。その上清液に飽和度0.3になるように硫酸安を加え溶解させ、4°C、4時間放置した後、遠心分離することにより上清を回収した。

【0064】更に、その液に飽和度0.8になるように硫酸安を加え溶解させ、4°C、一夜放置した後、遠心分離することにより硫酸安塩析物を回収した。

【0065】得られた硫酸安塩析物を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液(400ml)を2回に分けて、DEAE-トヨパールゲル(東ソー株式会社製)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。

【0066】本発明のマルトース・トレハロース変換酵素はDEAE-トヨパールゲルに吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。溶出した酵素活性画分を回収した後、1M硫酸安を含む同緩衝液に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、次に、ブチルトヨパール 650ゲル(東ソー株式会社製)を用いた疎水カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。吸着したマルトース・トレハロース変換酵素を硫酸安1Mから0Mのリニアグレジェントによりカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。

【0067】続いて、モノQ HR5/5カラム(スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)を用いたイオン交換クロマトグラフィー(ゲル量10ml)を行い、溶出した酵素活性画分を回収した。精製の各ステップにおける酵素活性量、比活性、収率を表1に示す。

【0068】

【表1】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
破砕後の上清液	7310	0.13	100
破砕分画後の透析液	2730	0.16	37.3
イオン交換カラム溶出液	2290	0.68	31.3
疊水カラム溶出液	1160	5.4	15.9
イオン交換カラム溶出液	818	16.8	11.2

【0069】精製した酵素標品を7.5%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは单一で純度の高い標品であった。

【0070】

【実験3 酵素の性質】実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度10%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約57,000乃至67,000ダルトンであった。

【0071】精製マルトース・トレハロース変換酵素標品を2%アンフォライン(スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約4.1乃至5.1であった。

【0072】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図1(温度の影響)、図2(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、60分間反応で20°C付近、至適pHは、25°C、60分間反応で約7.0乃至8.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液、pH7.0)を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で20°C、60分間保持した後、pHを7.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図3(温度安定性)、図4(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は30°C付近ま

でであり、pH安定性は約6.0乃至9.0であった。なお、本酵素活性は、1mMCu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50mMトリス塩酸緩衝液で阻害された。

【0073】

【実験4 各種糖質への作用】各種糖質を用いて、基質になりうるかどうかの試験をした。グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペントオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、可溶性澱粉、アミロース(平均重合度18)、トレハロース、ネオトレハロース、ゲンチオビオース、コージビオース、イソマルトース、セロビオース、マルチトール、シュクロース、マルツロース、ツラノース、パラチノース、トレハルロース、あるいはラクトースの溶液、更に、α-グルコース・1-リン酸と等量のグルコース、又は、β-グルコース・1-リン酸と等量のグルコースとを含む溶液を調製した。

【0074】これらの溶液に、実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素を基質固形物グラム当たりそれぞれ2単位ずつ加え、基質濃度を5w/v%になるよう調整し、これを20°C、pH7.0で24時間作用させた。酵素反応前後の反応液をキーゼルゲル60(メルク社製、アルミプレート、20×20cm)を用いた薄層クロマトグラフィー(以下、TLCと略称する。)にかけ、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。TLCは展開溶媒に1-ブタノール:ピリジン:水=6:4:1(容積比)を用い、室温で1回展開した。発色は20%硫酸-メタノール溶液を噴霧し、110°Cで10分間加熱しておこなった。結果を表2に示す。

【0075】

【表2】

基質	酵素作用	基質	酵素作用
グルコース	-	セロビオース	-
マルトース	++	マルチトール	-
マルトトリオース	-	シュクロース	-
マルトテトラオース	-	マルツロース	-
マルトペンタオース	-	ツラノース	-
マルトヘキサオース	-	バラチノース	-
マルトヘプタオース	-	トレハルロース	-
可溶性澱粉	-	ラクトース	-
アミロース	-	α -グルコース・1-リン酸	-
(平均重合度18)		+グルコース	
トレハロース	+	β -グルコース・1-リン酸	-
ネオトレハロース	-	+グルコース	
ゲンチオビオース	-		
コーデビオース	-		
イソマルトース	-		

注) 酵素反応前後で、

-は、変化無しを示し、

+は、基質のスポットが僅かに減少し、他の生成物がみとめられるを示し、

++は、基質のスポットがかなり減少し、他の生成物がみとめられるを示す。

【0076】表2の結果から明かなように、本発明の酵素は、試験した多種の糖質のうち、マルトースとトレハロースにのみ作用し、その他の糖質、とりわけ、 α -グルコース・1-リン酸とグルコースとを含む系や、 β -グルコース・1-リン酸とグルコースとを含む系に作用しないことから、従来知られているマルトース・ホスホリラーゼやトレハロース・ホスホリラーゼなどのホスホリラーゼとは違い、新規な酵素であることが判明した。

【0077】

【実験5 マルトース又はトレハロースからの生成物】最終濃度5%のマルトース水溶液に実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素を基質固形物グラム当たり2単位加え、20°C、pH7.0で24時間作用させた。酵素反応液の糖組成は、ガスクロマトグラ

フー(以下、GLCと略称する。)で分析した。酵素反応液の一部を乾固し、ピリジンに溶解した後トリメチルシリル化したものを分析試料とした。ガスクロマトグラフ装置はGC-16A(株式会社島津製作所製)、カラムは2%シリコンOV-17/クロモゾルB(ジー・エル・サイエンス株式会社製)を充填したステンレスカラム(3mmφ×2m)、キャリアーガスは窒素ガスを流量40ml/分で、カラムオーブン温度は160°Cから320°Cまで7.5°C/分の昇温速度で分析した。検出は水素炎イオン検出器を用いた。その結果を表3に示す。

【0078】

【表3】

反応物中の糖	GLC保持時間(分)	糖組成(%)
グルコース	3.87および4.70	4.9
マルトース	11.93および12.27	22.3
X	12.34*	72.8

注) *は、トレハロースの保持時間と一致する。

【0079】表3の結果から明かなように、反応生成物Xが多量に生成し、その保持時間が市販トレハロースのそれと一致していることが判明した。反応生成物Xを同定するために次の確認試験を行った。すなわち、前述のマルトースを基質とした酵素反応液を糖濃度2%になる

よう20mM酢酸緩衝液、pH4.5で希釈し、この0.5mlにグルコアミラーゼ(生化学工業株式会社製)0.1単位を加え40°Cで20時間反応させた。

【0080】また、同様に酵素反応液を糖濃度2%になるよう20mMリン酸緩衝液、pH7.0で希釈し、こ

の0.5m1にトレハラーゼ0.5単位を加え40°Cで20時間反応させた。マルトースを基質とした酵素反応液、そのグルコアミラーゼ処理液及びトレハラーゼ処理液をGLCで分析、比較したところ、グルコアミラーゼ処理によりマルトースは完全にグルコースに分解され、反応生成物Xは分解されずに残存していた。

【0081】一方、トレハラーゼ処理によりマルトースは残存していたが、反応生成物Xは完全にグルコースに分解された。グルコアミラーゼ及びトレハラーゼの反応特性を考慮すると、本発明の新規酵素によって生成する

10

マルトースからのオリゴ糖はトレハロースであると判断される。

【0082】更に、トレハロースを基質として、マルトースの場合と同様の条件で精製酵素を作用させ、その反応液も同様にGLC分析したところ、本発明の酵素によってトレハロースからはマルトースが生成することが判明した。以上のGLC分析結果をまとめて表4に示す。

【0083】

【表4】

基質	反応物中の糖	本発明の酵素による反応物糖組成(%)	グルコアミラーゼ処理後の糖組成(%)	トレハラーゼ処理後の糖組成(%)
マルトース	グルコース	4.9	27.9	78.5
	マルトース	22.3	0.0	21.5
	トレハロース	72.8	72.1	0.0
トレハロース	グルコース	3.2	19.9	83.3
	マルトース	17.2	0.0	16.7
	トレハロース	79.6	80.1	0.0

【0084】表4の結果から明かなように、本発明の酵素は、マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。その平衡点は、トレハロース側に片寄っており、マルトースからのトレハロースへの変換率が高く、約70%以上になることが判明した。

【0085】

【実験6 トレハロース生成に及ぼすマルトース濃度の影響】マルトース濃度を2.5%、5%、10%、20%あるいは40%で、温度20°C、pH7.0にて、実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2単位加えて反応させ、経時的に反応液を採取し、100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。

【0086】この反応液の全糖量をアンスロン硫酸法で、還元糖量をソモギー・ネルソン法でグルコース換算

で定量し、全糖量に対する還元糖量の割合を還元力として算出した。

【0087】また、この反応液を糖濃度約1%になるよう希釈し、少量限外濾過器モルカットII-LGC（日本ミリポアリミテッド製）にて除蛋白を行い、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCと略称する。）にて糖組成を分析した。HPLCの装置はCCPDシステム（東ソー株式会社製）、分析カラムはYMC-pack PA-03 (4.6mmφ×250mm、株式会社ワイエムシー製)、溶離液はアセトニトリル：水=78:22(容積比)を流速1.2ml/minで、検出は示差屈折計で行った。それらの結果を表5に示す。

【0088】

【表5】

マルトース 濃度 (%)	反応時間 (時間)	還元力 (%)	糖組成 (%)		
			グルコース	マルトース	トレハロース
	0	50.3	0.0	100.0	0.0
2.5	2	36.7	1.3	68.8	29.9
	8	21.2	2.5	38.7	58.8
	23	12.3	3.8	17.2	79.0
	48	14.5	5.9	17.1	77.0
5.0	2	34.8	1.9	65.3	32.8
	8	20.2	2.6	35.7	61.7
	23	12.0	3.2	17.3	79.5
	48	14.2	5.7	17.3	77.0
10.0	2	32.2	1.3	63.0	35.7
	8	19.7	2.2	34.2	63.6
	23	12.5	3.6	17.5	78.9
	48	14.0	6.1	17.4	76.5
20.0	2	34.2	2.0	63.7	34.3
	8	20.2	2.9	35.1	62.0
	23	12.9	3.4	17.4	79.2
	48	15.1	6.0	17.4	76.6
40.0	2	34.8	1.6	68.2	30.2
	8	21.2	2.7	38.6	58.7
	23	12.8	3.7	17.7	78.6
	48	14.9	5.7	17.5	76.8

【0089】表5の結果から明かなように、基質のマルトース濃度に関係なく、マルトースからのトレハロースへの変換反応はよく進行し、トレハロースへ約80%変換した。

【0090】

【実験7 トレハロース生成に及ぼす温度の影響】マルトース濃度20%で、pH 7.0にして、実験2の方法 40で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルト

ースグラム当たり2単位加えて、温度5°C、10°C、15°C、20°Cあるいは25°Cで反応させ、経時的に反応液を採取し、100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。この酵素反応液を実験6と同様にして、HPLCにて糖組成を分析した。各温度、各時間でのトレハロース含量を表6に示す。

【0091】

【表6】

反応時間 (時間)	トレハロース含量(%)				
	5(℃)	10(℃)	15(℃)	20(℃)	25(℃)
2	26.1	28.9	32.9	34.6	34.7
8	49.5	54.3	61.2	62.0	61.1
23	78.2	79.5	80.9	79.2	78.7
48	81.8	80.9	80.4	78.6	72.7

【0092】表6の結果から明かなように、反応温度が高いほどトレハロース生成速度は高くなる傾向にあったが、温度5℃でもマルトースからのトレハロースへの変換反応はよく進行し、トレハロースへ約8.2%変換した。

【0093】

【実験8 マルトースからのトレハロースの調製】マルトース(株式会社林原生物化学研究所製)10重量部を水40重量部に溶解し、温度15℃、pH7.0にて、実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2単位加えて48時間反応させ、次いで100℃で10分間加熱して酵素を失活させた。本溶液には、トレハロースを固形物当たり約7.4%含有していた。本溶液を活性炭で脱色し、イオン交換樹脂(H型及びOH型)にて脱塩して精製し、濃度約7.8%に濃縮して、トレハロース含水結晶を種晶として固形物当たり0.1%添加し、室温に一夜放置したところ、結晶が析出した。得られたマスケットを分離し、結晶に少量の水をスプレーして結晶を洗浄し、純度99.8%の極めて高純度のトレハロース含水結晶約3.0重量部を得た。

【0094】

【実験9 酵素の生産】グルコース2.0w/v%、硫酸アンモニウム1.0w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム0.06w/v%、硫酸マグネシウム0.05w/v%、炭酸カルシウム0.3w/v%、及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで115℃で、30分間滅菌し、冷却して、シュードモナス・プチダ H262(FERM BP-4579)を接種し、27℃、200rpmで24時間回転振とう培養したものと種培養とした。

【0095】容量30lのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、pH6.5乃至8.0に保ちつつ、約20時間通気攪拌培養した。

【0096】培養液のマルトース・トレハロース変換酵素活性は、0.12単位/m1であった。培養液の一部を採り、遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更

に菌体を50mMリン酸塩緩衝液(pH7.0)に懸濁し、元の培養液と同じ液量とした後、菌体懸濁液と培養液上清のマルトース・トレハロース変換酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、0.11単位/m1の活性が、培養液上清には、0.01単位/m1の活性が認められた。なお、本酵素の活性は、反応温度を35℃にして測定した。

【0097】

【実験10 酵素の精製】実験9で得た培養液を遠心分離して湿重量約0.45kgの菌体を回収し、これを10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した。この菌体懸濁液約2lを超高压菌体破碎装置ミニラボ(大日本製薬株式会社販売)で処理し、菌体を破碎し、この破碎処理液を遠心分離(15,000G、30分間)することにより、約1.7lの上清を得た。その上清液に飽和度0.7になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、一夜放置した後、遠心分離することにより硫酸塩析物を回収した。

【0098】得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液(400ml)を2回に分けて、DEAE-トヨパールゲル(東ソー株式会社製)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量300ml)を行った。

【0099】本発明のマルトース・トレハロース変換酵素はDEAE-トヨパールゲルに吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。溶出した酵素活性画分を回収した後、同緩衝液に対して透析し、再度、DEAE-トヨパールイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量80ml)を行った。吸着したマルトース・トレハロース変換酵素を食塩0.1Mから0.3Mのリニアグリセントによりカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。

【0100】続いて、トヨパール HW-55S(東ソー株式会社製造)を用いたゲル濾過クロマトグラフィー(ゲル量400ml)を行い、溶出した酵素活性画分を回収した。精製の各ステップにおける酵素活性量、比活性、收率を表7に示す。

【0101】

【表7】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
破碎後の上清液	1750	0.04	100
硅安分離後の透析液	1200	0.07	68.5
第1回イオン交換カラム溶出液	1090	0.53	62.3
第2回イオン交換カラム溶出液	360	4.5	20.6
ゲル通過カラム溶出液	156	6.5	8.9

【0102】精製した酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは单一で純度の高い標品であった。

【0103】

【実験11 酵素の性質】実験10の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度7.5w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約110,000乃至120,000ダルトンであった。

【0104】精製マルトース・トレハロース変換酵素標品を2w/v%アンフォライン(スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約4.1乃至5.1であった。

【0105】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図5(温度の影響)、図6(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、60分間反応で37°C付近、至適pHは、35°C、60分間反応で約7.3乃至8.3であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液、pH7.0)を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で35°C、60分間保持した後、pHを7.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求め

た。それぞれの結果を図7(温度安定性)、図8(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は40°C付近までであり、pH安定性は約6.0乃至9.5であった。なお、本酵素活性は、1mMCu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50mMトリス塩酸緩衝液で阻害された。

【0106】

【実験12 各種糖質への作用】反応温度を35°Cとした以外は、実験4の方法に準じて、実験10で得たシュードモナス・プチダ H262の精製酵素を各種糖質に作用させて、基質になりうるかどうかの試験をした。その結果、シュードモナス・プチダ H262の酵素は、ピメロバクター・スピーシーズ R48の酵素と同様、マルトースとトレハロースにのみ作用しマルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換した。その平衡点は、トレハロース側に片寄っており、マルトースからのトレハロースへの変換率が高く、約70%になることが判明した。

【0107】

【実験13 トレハロース生成に及ぼすマルトース濃度の影響】マルトース濃度を5%、10%、20%あるいは30%で、温度35°C、pH7.0にて、実験10の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2単位加えて反応させ、経時的に反応液を採取し、100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。

【0108】この反応液を用いて、実験6と同様に還元力及び糖組成を測定した。それらの結果を表8に示す。

【0109】

【表8】

マルトース 濃度 (%)	反応時間 (時間)	還元力 (%)	糖組成 (%)		
			グルコース	マルトース	トレハロース
	0	50.3	0.0	100.0	0.0
5.0	2	43.8	0.8	88.0	11.2
	7	35.0	0.5	72.7	26.8
	24	17.2	0.5	41.8	57.7
	48	10.3	1.8	29.7	68.5
10.0	2	46.8	1.2	86.5	12.3
	7	34.6	1.4	64.9	33.7
	24	16.0	2.2	36.4	61.4
	48	14.8	3.7	26.5	69.8
20.0	2	44.9	0.7	86.6	12.7
	7	32.7	1.2	66.6	32.2
	24	21.0	2.6	35.8	61.6
	48	11.2	3.9	27.0	69.1
30.0	2	44.8	0.0	89.5	10.5
	7	38.2	0.6	72.5	26.9
	24	17.8	1.8	41.8	56.4
	48	12.9	3.9	29.6	66.5

【0110】表8の結果から明らかなように、基質のマルトース濃度に関係なく、トレハロースを約70%生成した。

【0111】

【実験14 マルトースからのトレハロースの調製】マルトース(株式会社林原生物化学研究所販売)10重量部を水40重量部に溶解し、温度35°C、pH7.0にして、本発明の精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2単位加えて48時間反応させ、次いで100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。本溶液には、トレハロースを固形物当たり約6.9%含有していた。本溶液を活性炭で脱色し、イオン交換樹脂(H型及びOH型)にて脱塩して精製し、濃度約7.8%に濃縮して、トレハロース含水結晶を種晶として固形物当たり0.1%添加し、室温に一夜放置したところ、結晶が析出した。得られたマスキットを分蜜し、結晶に少量の水をプレーして結晶を洗净し、純度99.7%の極めて高純度のトレハロース結晶約2.3重量部を得た。

【0112】

【実験15 酵素の生産】ポリペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、硝酸ナトリウム0.050

7w/v%、リン酸二ナトリウム0.01w/v%、硫酸マグネシウム0.02w/v%、塩化カルシウム0.01w/v%及び水からなる液体培地を、pH7.5に調整した後、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで120°Cで、20分間滅菌し、冷却して、サーマス・アクアティカス ATCC33923を接種し、60°C、200rpmで24時間回転振とう培養したものを種培養とした。

【0113】容量30lのファーメンター2基に種培養の場合と同組成の培地をそれぞれ約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度60°Cとした後、種培養液1v/v%を接種し、温度60°C、pH6.5乃至8.0に保ちつつ、約20時間通気攪拌培養した。

【0114】培養液のマルトース・トレハロース変換酵素活性は0.35単位/m1であった。培養液の一部を採り、遠心分離して菌体と培養上清液とに分離し、更に菌体を50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、元の培養液と同じ液量とした後、菌体懸濁液と培養上清液のマルトース・トレハロース変換酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には0.33単位/m1の酵素活性が、また、培養液上清には0.02単位/m1の酵素活性が認められた。なお、本酵素の活性は、反応温度を6

0°Cにして測定した。

【0115】

【実験16 酵素の精製】実験15で得られた培養液を遠心分離して湿重量約0.28kgの菌体を回収し、これを10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した。この菌体懸濁液約1.9lを、超音波破碎機 モデルUS300(株式会社日本精機製作所製)で処理し、菌体を破碎した。この破碎処理液を遠心分離(15,000G、30分間)することにより、約1.8lの上清を得た。その上清に飽和度0.7になるように硫酸を加え溶解させ、4°C、一夜放置した後、遠心分離機にかけ、硫酸塩析物を回収した。

【0116】得られた硫酸塩析物を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液(1560ml)を、DEAE-トヨパール650ゲル(東ソー株式会社製)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量530ml)を3回に分けて行った。

【0117】本発明のマルトース・トレハロース変換酵素はDEAE-トヨパールゲルに吸着し、食塩を含む同

緩衝液でカラムから溶出した。溶出した酵素活性画分を回収した後、1M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、次に、ブチルトヨパール650ゲル(東ソー株式会社製)を用いた疎水カラムクロマトグラフィー(ゲル量380ml)を行った。吸着したマルトース・トレハロース変換酵素を硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントによりカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。

【0118】次に、トヨパールHW-55S(東ソー株式会社製)を用いたゲル滌過クロマトグラフィー(ゲル量380ml)を行い、溶出した酵素活性画分を回収した。

【0119】続いて、モノQ HR5/5カラム(スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)を用いたイオン交換クロマトグラフィー(ゲル量1.0ml)を行い、食塩0.1Mから0.35Mのリニアグラジエントにより溶出した酵素活性画分を回収した。精製の各ステップにおける酵素活性量、比活性、収率を表9に示す。

【0120】

20 【表9】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
破碎後の上清液	8800	0.10	100
硫酸分画後の透析液	8710	0.16	99.0
イオン交換カラム溶出液	5690	2.5	64.7
疎水カラム溶出液	2050	17.6	23.3
ゲル滌過カラム溶出液	937	113	10.6
イオン交換カラム溶出液	467	135	5.3

【0121】精製した酵素標品を5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは单一で純度の高い標品であった。

【0122】

【実験17 酵素の性質】実験16の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度7.5w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約100,000乃至110,000ダルトンであった。

【0123】精製マルトース・トレハロース変換酵素標品を2%w/vアンフォライン(スウェーデン国、ファルマシア・エルケイビー社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約3.8乃至4.8であった。

【0124】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図9(温度の影響)、図10(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、60分間反応で65°C付近、至適pHは、60°C、60分間反応で6.0乃至6.7であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(50mMリン酸緩衝液を含む、pH7.0)を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの50mM緩衝液中で60°C、60分間保持した後、pHを7.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図11(温度安定性)、図12(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は約80°C付近まであり、pH安定性は5.5乃至9.5であった。なお、本酵素活性は、1mMCu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50mMトリス塩酸緩衝液で阻害された。

【0125】

50 【実験18 各種糖質への作用】反応温度を50°Cとし

た以外は、実験4の方法に準じて、実験16で得たサーマス・アクアティカス ATCC33923の精製酵素を各種糖質に作用させて、基質になりうるかどうかの試験をした。その結果、サーマス・アクアティカス ATCC33923の酵素はピメロバクター・スピーシーズ R48の酵素、あるいは、シードモナス・プチダ H262の酵素と同様、マルトースとトレハロースにのみ作用しマルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換した。その平衡点は、トレハロース側に片寄っており、マルトースからトレハロースへの変換率が高く、70%以上になることが判明した。

【0126】

マルトース濃度 (%)	反応時間 (時間)	還元力 (%)	糖組成 (%)		
			グルコース	マルトース	トレハロース
	0	50.4	0.0	100.0	0.0
2.5	72	16.3	4.5	25.2	70.3
5.0	72	15.9	4.4	25.8	70.0
10.0	72	16.0	4.7	25.8	69.7
20.0	72	16.8	4.4	26.2	69.4
40.0	72	16.8	5.0	26.4	68.6

【0128】表10の結果から明らかなように、基質のマルトース濃度に関係なく、トレハロースを約70%生成した。

【0129】

【実験20 トレハロース生成に及ぼす温度の影響】マルトース濃度20%で、pH6.5にして、実験16の方法で得たサーマス・アクアティカス ATCC33923の精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルト

【実験19 トレハロース生成に及ぼすマルトース濃度の影響】マルトース濃度を2.5%、5%、10%、20%あるいは40%で、温度60°C、pH6.5にて、実験16の方法で得たサーマス・アクアティカス ATCC33923の精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2.5単位加えて反応させ、72時間目に反応液を採取し、100°Cで30分間加熱して酵素を失活させた。この反応液を用いて、実験6と同様に還元力及び糖組成を測定した。その結果を表10に示した。

【0127】

【表10】

ースグラム当たり2.5単位加えて、温度40°C、50°C、60°C、あるいは70°Cで反応させ、経時的に反応液を採取し、100°Cで30分間加熱して酵素を失活させた。この反応液を実験6と同様にして、HPLCにて糖組成を分析した。各温度、各時間でのトレハロース含量を表11に示す。

【0130】

【表11】

反応時間 (時間)	トレハロース含量 (%)			
	40 (°C)	50 (°C)	60 (°C)	70 (°C)
4	45.0	55.7	56.8	50.3
8	61.0	67.3	64.3	58.5
24	79.1	78.5	71.1	64.3
48	80.7	78.9	70.2	62.8
72	80.0	78.4	68.5	60.2

【0131】表11の結果から明らかなように、マルトースからのトレハロースへの変換率は反応温度が低いほど高く、40°Cにおいてトレハロースへ約80%変換した。

【0132】【実験21 他の微生物からのマルトース・トレハロース変換酵素の生産とその性質】

公知微生物のうち、本発明のマルトース・トレハロース変換酵素生产能の確認された特定の微生物を、実験15の場合に準じて三角フラスコにて48時間培養した。培養液の酵素活性を調べた後、実験16の方法に準じて、培養液を破碎装置にか

け、その上清を透析して、部分精製酵素を得、実験17の方法に従って、その性質を調べた。結果を表12に示した。

【0133】

【表12】

微生物名	活性 (単位/mg)	至適温度	至適pH	温度安定性	pH安定性
サーマス・アクアティカス (<i>Thermus aquaticus</i>) ATCC27634	0.30	65℃附近	約6.0乃至6.5	80℃付近まで 約5.5乃至9.6	
サーマス・ルーバー (<i>Thermus ruber</i>) ATCC35948	0.26	50℃附近	約6.0乃至7.0	50℃付近まで 約5.5乃至10.0	
サーマス・スピーシーズ (<i>Thermus sp.</i>) ATCC43815	0.25	65℃附近	約6.0乃至6.5	80℃付近まで 約5.5乃至9.5	
実験1乃至3配載の ピメロバクター・スピーシーズ R48	0.55	20℃附近	約7.0乃至8.0	30℃付近まで 約6.0乃至9.0	
実験1乃至14配載の シュードモナス・プチダ H262	0.12	37℃附近	約7.3乃至8.3	40℃付近まで 約6.0乃至9.5	
実験18乃至20配載の サーマス・アクアティカス ATCC33923	0.35	65℃附近	約6.0乃至6.7	80℃付近まで 約5.5乃至9.5	

【0134】表12に示すこれらサーマス属に属する公知微生物由来の部分精製酵素を用いて、実験18の方法に従って、各種糖質への作用を調べたところ、サーマス・アクアティカス ATCC33923由来の酵素の場合と同様に、マルトースとトレハロースにのみ作用し、マルトースからトレハロースを生成することが判明した。

【0135】また、サーマス・ルーバー ATCC35948のマルトース・トレハロース変換酵素は、サーマス・アクアティカス ATCC33923の酵素に比し、その至適温度、安定温度は低かったが、他のサーマス属の酵素は、サーマス・アクアティカス ATCC3

3923の酵素とほぼ同じ性質を示し、耐熱性の高いことが判明した。

【0136】

【実験22 マルトース・トレハロース変換酵素の部分アミノ酸配列】実験2の方法で得られたピメロバクター・スピーシーズ R48由来の精製酵素標品、実験10の方法で得られたシュードモナス・プチダ H262由来の精製酵素標品及び実験16の方法で得られたサーマス・アクアティカス ATCC33923由来の精製酵素標品の一部を、それぞれ蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約80μgをN末端アミノ酸配列分析用の試料とした。N末端アミノ酸配列は、プロテインシーケ

ンサーモデル473A（アプライドバイオシステムズ社
製造、米国）を用いて分析した。それぞれ得られたN末端
端配列を表13に示す。

【0137】

【表13】

微生物名	N末端アミノ酸配列									
	1 グ リ ー ジ ン シ ン	ト リ ー ロ ー ブ ト フ アン	5 アル ギ ニ ン	ブ ロ ー ロ ー ブ ト フ アン	ア ラ ー リ ン	ア ラ ニ ン	ア ラ ニ ン	ア ラ ニ ン	ア ス ロ イ シ ン	ア ス パ ラ ギ ン 酸
ショードモナス・ プチダ H262	1 セ リ ー レ ー バ ー ン ニ ン	ト リ ー ロ ー イ ー シ ン ン	5 グ リ ー ル ー タ ミ ン 酸	グ ル ー タ ミ ン 酸	ブ ロ ー ロ ー ブ ト フ アン	10 ト リ ー エ ニ ル ア ラ ニ ン	ア ル ギ ニ ン	ト レ オ ニ ン	ア ラ ニ ン	15 バ ー リ ン ル ア ラ ニ ン
ピメロバクター・ スピーシーズ R48	1 セ リ ー レ ー バ ー ン ニ ン	ト リ ー ロ ー イ ー シ ン ン	5 グ リ ー ル ー タ ミ ン 酸	グ ル ー タ ミ ン 酸	ブ ロ ー ロ ー ブ ト フ アン	10 ト リ ー エ ニ ル ア ラ ニ ン	ア ル ギ ニ ン	ト レ オ ニ ン	ア ラ ニ ン	15 バ ー リ ン ル ア ラ ニ ン
サーマス・ アクアティカス ATCC33923	1 メ チ オ ニ ン	ア ス バ ラ ギ ン 酸	2 プロ ーリ ン	3 ロ ーイ シ ン	4 ト リ ー ブ ト フ アン	5 チ ロ ー リ ン	6 ジ ー ス バ ラ ギ ン 酸	7 ア ラ ニ ン	8 ア ラ ニ ン	9 バ ー リ ン イ ソ ロ イ シ ン

注) N末端アミノ酸配列に示す数字は、アミノ酸残基のN末端側からの順番を意味する。

【0138】表13の結果から明かなように、ピメロバクター・スピーシーズ R48由来の酵素と、ショードモナス・プチダ H262由来の酵素及びサーマス・アクアティカス ATCC33923由来の酵素とは、相同性の極めて高い部分アミノ酸配列を有していることが判明した。すなわち、ピメロバクター属微生物由来酵素のN末端側から第10番目のトリプトファンから第16番目のフェニルアラニンまでの部分アミノ酸配列とショードモナス属微生物由来酵素のN末端側から第3番目のトリプトファンから第9番目のフェニルアラニンまでの部分アミノ酸配列とは、相同性が高く、トリプトファン-X₁-アルギニン-X₂-アラニン-X₃-フェニルアラニン(但し、X₁はフェニルアラニン又はプロリンを意味し、X₂はトレオニン又はプロリンを意味し、X₃はバリン又はアラニンを意味する。)で表すことができる。また、ピメロバクター属微生物由来酵素のN末端側から14番目のアラニンから17番目のチロシンまでの部分アミノ酸配列とサーマス属微生物由来酵素のN末端側から9番目のアラニンから12番目のチロシンまでの部分アミノ酸配列とは、相同性が高く、アラニン-バリン-X₁-チロシン(但し、X₁はフェニルアラニン又はイソロイシンを意味する。)で表すことができる。

【0139】

【実験23 調製したトレハロースの理化学的性質】実験8の方法で調製したトレハロースの高純度標品を用いて理化学的性質を調べた。融点は97.0°C、比旋光度は $[\alpha]^{20} +199^\circ$ (c=5)、融解熱は57.8 KJ/mole、溶解度は25°Cの水に対し、無水物として77.0 gであった。これらの物性値は、同時に測定した市販トレハロース含水結晶(和光純薬工業株式会社製)の値とよく一致した。

【0140】

【実験24 生体内での利用試験】厚治等が、『臨床栄養』、第41巻、第2号、第200乃至208頁(1972年)で報告している方法に準じて、実験8において

30 調製した高純度トレハロース標品(純度99.8%)30gを20w/v%水溶液とし、これをボランティア3名(健康な26才、27才、30才の男性)にそれぞれ経口投与し、経時的に採血して、血糖値及びインスリン値を測定した。対照としては、グルコースを用いた。その結果、トレハロースは、グルコースの場合と同様の挙動を示し、血糖値、インスリン値とともに、投与後、約0.5乃至1時間で最大値を示した。トレハロースは、容易に消化吸収、代謝利用されて、エネルギー源になることが判明した。従って、本発明の方法で得られるトレハロース及びこれを含む糖質は、エネルギー補給用糖源

として好適である。

【0141】

【実験25 急性毒性試験】マウスを使用して、実験8において調製した高純度トレハロース標品（純度99.8%）を経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、トレハロースは低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、そのLD₅₀値は、50g/kg以上であった。

【0142】以下、本発明のマルトース・トレハロース変換酵素とそれを利用したトレハロースとこれを含む糖質の製造方法を実施例Aで、トレハロースとこれを含む糖質を含有せしめた組成物を実施例Bで示す。

【0143】

【実施例A-1】ピメロバクター・スピーシーズ R48 (FERM BP-4315) を、培地成分中のグルコース濃度を4.0w/v%とした以外は実験1と同じ培地組成で、実験1の方法に準じてファーメンターで約60時間、通気攪拌培養した。この培養液のマルトース・トレハロース変換酵素の活性は、培養液m1当たり0.75単位であった。また、その一部を遠心分離により、菌体と培養上清とに分離し、活性を測定したところ、菌体にその約65%が、培養上清に約35%の活性が検出された。この菌体を含む培養液約35lを、超高压菌体破碎装置ミニラボ（大日本製薬株式会社製）で処理し、菌体を破碎した。この菌体破碎懸濁液を遠心分離機にかけ、その上清を回収し、更にその液をUF膜濃縮し、マルトース・トレハロース変換酵素をm1当たり約1.5単位有する濃縮酵素液約1.2lを回収した。10%馬鈴薯澱粉乳(pH5.5)にα-アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製、商品名スピターゼHS）を澱粉グラム当たり2単位加えて攪拌下、加熱糊化・液化させ、ただちにオートクレープ(120°C)を20分間行った後、温度50°C、pH5.0に調整した。これにβ-アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製）を澱粉グラム当たり20単位及びイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当たり500単位の割合になるように加え、24時間反応させ、マルトース含量約92%の糖液を得た。その反応液を100°Cで20分間加熱した後、温度10°C、pH7.0に調整し、これに前記方法で調製したマルトース・トレハロース変換酵素を固形物グラム当たり1単位の割合になるよう加え、96時間反応させた。その反応液を95°Cで10分間保った後、冷却し、常法に従って活性炭で脱色・濾過し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固形物収率約95%で得た。本品は、固形物当たりトレハロースを約69%含有していて還元力がDE18.2と低く、温和な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、安定剤、賦形剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0144】

【実施例A-2】実施例A-1の方法で得たマルトース・トレハロース変換酵素反応停止液に、固形物当たり10単位のグルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製、商品名グルコチーム）をpH5.0、50°Cで24時間作用させ、次いで、加熱失活、脱色、脱塩精製して得られる糖液を原糖液とし、トレハロースの含量を高めるため、アルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂（XT-1016、Na⁺型、架橋度4%、東京有機化学工業株式会社製）を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ、樹脂層全長20mとした。カラム内温度60°Cに維持しつつ、糖液を樹脂に対して、5v/v%加え、これに60°Cの温水をSV0.15で流して分画し、グルコースを除去し、トレハロース高含有画分を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、トレハロース高含有粉末を固形物当たり、約55%の収率で得た。本品は、トレハロースを約97%含有しており、極めて低い還元性、まろやかで上品な甘味を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0145】

【実施例A-3】実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有画分を、常法に従って、活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩して精製した溶液を濃度約70%に濃縮した後、助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶約2%を加えて徐冷し、晶出率約45%のマスクットを得た。本マスクットを乾燥塔上のノズルより150kg/cm²の高压にて噴霧した。これと同時に85°Cの熱風を乾燥塔の上部より送風して底部に設けた移送金網コンベア上に捕集し、コンベアの下より45°Cの温風を送りつつ、金網コンベア上に捕集した結晶粉末を乾燥塔外に徐々に移動させ取り出した。この取り出した結晶粉末を、熟成塔に充填して温風を送りつつ10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレハロース含水結晶粉末を原料のトレハロース高含有糖液に対して固形物当たり約90%の収率で得た。本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、安定剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0146】

【実施例A-4】実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有画分を、実施例A-3と同様に精製し、次いで、蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約3.0%のシラップとした。次いで、助晶機に移し、これに種晶として無水結晶トレハロースをシラップ固形物当たり1%加え、120°Cで攪拌助晶し、次いで、アルミ製バット

に取り出し、100°Cで6時間晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎し、流動乾燥して、水分約0.3%の無水結晶トレハロース粉末を、原料のトレハロース高含有糖液に対して、固形物当たり約85%の收率で得た。本品は、食品、化粧品、医薬品、その原材料、又は加工中間物などの含水物の脱水剤としてのみならず、上品な甘味を有する白色粉末甘味料としても、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0147】

【実施例A-5】ピメロバクター・スピーシーズ R48 (FERM BP-4315) を実験1と同様の方法で培養し、さらに遠心分離して得た湿菌体100g(約800単位)を10mMリン酸緩衝液に溶解した2.5%アルギン酸ナトリウム(300乃至400cp、和光純薬工業株式会社製)100mlに混練した。この菌体を含むスラリーを、マグネティックスターラーで攪拌している0.1M CaCl₂溶液中に、水面より約20cmの高さから連続的に滴下し、直径2mm前後の球状のゲル化物を形成させた。このゲル化物をCaCl₂溶液中に室温で約2時間保った後、ブッフナーロート上で濾過して、アルギン酸固定化菌体を回収した。この固定化菌体を直径30mm、長さ200mmのジャケット付きガラスカラムに充填し、温度を20°Cに保溫した。この固定化菌体カラムにpH 6.8のマルトース40%溶液をSV0.2にて下向流で通液し、トレハロース含量約70%の糖液を得た。本糖液を実施例A-1の方法に準じて、精製、濃縮して、濃度約70%のシラップを固形物收率約95%で得た。本品は、低還元性、温和な甘味、適度の保湿性を有し、実施例A-1の場合と同様に各種組成物に有利に利用できる。

【0148】

【実施例A-6】33%とうもろこし澱粉乳に最終濃度0.1重量%となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH 6.5に調整し、これにα-アミラーゼ(ノボ社製、商品名ターマミール60L)を澱粉グラム当たり0.2重量%になるよう加え、95°Cで15分間反応させた。その反応液をオートクレーブ(120°C)を30分間行った後、55°Cに冷却し、これにイソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製)を澱粉グラム当たり500単位及びβ-アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製)を澱粉グラム当たり30単位の割合になるよう加え、48時間反応させマルトース含量約84%の糖液を得た。その反応液を、100°Cで10分間加熱し、次いで15°Cに冷却し、実施例A-1の方法で調製したマルトース・トレハロース変換酵素を固形物グラム当たり1.5単位の割合になるよう加え、72時間反応させた。その反応液を100°Cで15分間加熱して酵素を失活させた後、常法に従って活性炭で脱色・濾過し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に

濃縮して濃度約70%のシラップを固形物收率約95%で得た。本品は、固形物当たりトレハロースを約64%を含有しており、低還元性、温和な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、実施例A-1の場合と同様に、各種組成物に有利に利用できる。

【0149】

【実施例A-7】実施例A-5の方法で得たシラップを濃度約82%に濃縮して助晶機にとり、種晶約1%を混合した後、バットにとり、20°Cで4日間静置して晶出固化させ、次いで切削機にて粉碎し、乾燥して含蜜型トレハロース含水結晶粉末を固形物收率約95%で得た。本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤などとして、実施例A-1の場合と同様に、各種組成物に有利に利用できる。

【0150】

【実施例A-8】実施例A-6の方法で得たシラップを濃度約80%に濃縮して助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶粉末約1%を加え、攪拌しつつ徐冷、晶出させた。次いで、バスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水でスプレーし、洗浄して高純度のトレハロース含水結晶を固形物收率約20%で得た。本品は、実験23と同様の理化学的性質を示し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。更には、工業試薬、化学原料などに利用することも有利に実施できる。

【0151】

【実施例A-9】シュードモナス・プチダ H262 (FERM BP-4579) を、実験9の方法に準じてファーメンターで約20時間、通気攪拌培養した。この培養液約18lを遠心分離にかけ、湿重量約0.4kgの菌体を得た。これを41の10mMリン酸緩衝液に懸濁し、超音波破碎機モデルUS300(株式会社日本精機製作所製)で処理し、菌体を破碎した。この菌体破碎懸濁液を遠心分離機にかけ、その上清を回収し、更にその液をUF膜濃縮し、マルトース・トレハロース変換酵素をm1当たり3.8単位有する濃縮酵素液約400m1を回収した。10%馬鈴薯澱粉乳(pH 5.5)にα-アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製、商品名スピターゼHS)を澱粉グラム当たり2単位加えて攪拌下、加熱糊化・液化させ、ただちにオートクレーブ(120°C)を20分間行った後、温度50°C、pH 5.5に調整した。これにプルラナーゼ(株式会社林原生物化学研究所製)を澱粉グラム当たり500単位及びβ-アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製)を澱粉グラム当たり20単位の割合になるよう加え、24時間反応させ、マルトース含量約92%の糖液を得た。その反応液を100°Cで20分間加熱した後、温度40°C、pH 7.0に調整し、これに前記方法で調製したマルトース

・トレハロース変換酵素を固形物グラム当たり1.5単位の割合になるよう加え、72時間反応させた。その反応液を95°Cで10分間保った後、冷却し、常法に従って活性炭で脱色・濾過し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固形物収率約97%で得た。本品は、固形物当たりトレハロースを約6.5%含有していて還元力がD.E 1.6. 2と低く、温和な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、安定剤、賦形剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0152】

【実施例A-10】実施例A-9の方法で得たマルトース・トレハロース変換酵素による反応終了液を95°Cで10分間保って酵素を失活させた後、pH 5.0、55°Cに調整して、グルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製、商品名グルコチーム）を固形物グラム当たり1.0単位加えて24時間反応させた。反応液を常法に従って、加熱して酵素を失活させ、脱色、脱塩して精製し、濃度5.5%に濃縮して糖液を得た。本糖液を原糖液とし、アルカリ土類金属型強酸性カチオン交換樹脂（ダウエックス99、Ca⁺⁺型、架橋度6%、ダウケミカル社製）を用いて、実施例A-2と同様にカラムクロマトグラフィーにかけ、トレハロース高含有画分を採取した。更に、これを精製し、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分離し、結晶を少量の水でスプレーし洗净して高純度のトレハロース含水結晶を固形物収率約25%で得た。本品は、実験23と同様の理化学的性質を示し、実施例A-8と同様に、各種飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに有利に利用できる。

【0153】

【実施例A-11】シードモナス・プチダ H 262 (FERM BP-4579) を実験9と同様の方法で培養し、さらに遠心分離して得た湿菌体100g(約400単位)を10mMリン酸緩衝液に溶解した2.5%アルギン酸ナトリウム(300~400cp、和光純薬工業株式会社販売)100mlに混練した。この菌体を含むスラリーを、マグネティックスターラーで攪拌している0.1M CaCl₂溶液中に、水面より約20cmの高さから連続的に滴下し、直徑2mm前後の球状のゲル化物を形成させた。このゲル化物をCaCl₂溶液中に室温で約2時間保った後、ブッフナーロート上で濾過して、アルギン酸固定化菌体を回収した。この固定化菌体を直徑30mm、長さ200mmのジャケット付きガラスカラムに充填し、温度を35°Cに保温した。この固定化菌体カラムにpH 6.8のマルトース40%溶液をSV0.1にて下向流で通液し、トレハロース含量67%の糖液を得た。本糖液を実施例A-9の方法に準じ

て、精製、濃縮し、これを助晶し、噴霧乾燥して含蜜型トレハロース含水結晶粉末を固形物収率約90%で得た。本品は、低還元性、温和な甘味、適度の保湿性を有し、実施例A-9の場合と同様に各種組成物に有利に利用できる。

【0154】

【実施例A-12】サーマス・アクアティカス ATC C 33923を、実験15の方法に準じてファーメンターで約20時間、通気攪拌培養した。この培養液のマル

トース・トレハロース変換酵素の活性は、培養液m1当たり0.32単位であった。この培養液約181から回収した湿重量0.18kgの菌体を10mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁した。この菌体懸濁液約1.51を、超音波破碎装置で処理し、菌体を破碎した。この菌体破碎懸濁液を遠心分離機にかけ、その上清を回収し、更にその液をUF膜濃縮し、マルトース・トレハロース変換酵素をm1当たり約1.0単位有する濃縮酵素液約5.00mlを回収した。15%とうもろこし澱粉乳(pH 5.5)にα-アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製、商品名スピターゼHS）を澱粉グラム当たり2単位加えて攪拌下、加熱糊化・液化させ、ただちにオートクレーブ(120°C)を20分間行った後、温度55°C、pH 5.0に調整した。これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当たり3.00単位及びβ-アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製）を澱粉グラム当たり2.0単位の割合になるように加え、24時間反応させ、マルトース含量約9.2%の糖液を得た。その反応液を100°Cで20分間加熱した後、温度50°C、pH 7.0に調整し、これに前記方法で調製したマルトース・トレハロース変換酵素を固形物グラム当たり1.5単位の割合になるよう加え、72時間反応させた。その反応液を95°Cで10分間保った後、冷却し、常法に従って活性炭で脱色・濾過し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固形物収率約95%で得た。本品は、固形物当たりトレハロースを約6.4%含有していて還元力がDE 1.8. 0と低く、温和な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、安定剤、賦形剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0155】

【実施例A-13】実施例A-12の方法で得たシラップを濃度約8.0%に濃縮して助晶機にとり、実施例A-8と同様に晶出、分離して高純度のトレハロース含水結晶を固形物収率約20%で得た。本品は、実験23と同様の理化学的性質を示し、実施例A-8と同様に、各種飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物、更には、工業試薬、工業原料、化学原料などに有利に利用できる。

【0156】

【実施例A-14】サーマス・アクアティカス ATC

C 3 3 9 2 3 を実験 1 5 と同様の方法で培養し、さらに遠心分離して得た湿菌体 5 0 g (約 1, 5 0 0 単位) を 1 0 mM リン酸緩衝液 (pH 7. 0) に溶解した 2. 5 % アルギン酸ナトリウム (3 0 0 乃至 4 0 0 c p, 和光純薬工業株式会社製) 1 0 0 m l に混練した。この菌体を含むスラリーを、マグネティックスターラーで攪拌している 0. 1 M C a C 1, 溶液中に、水面より約 2 0 c m の高さから連続的に滴下し、直径 2 mm 前後の球状のゲル化物を形成させた。このゲル化物を C a C 1, 溶液中に室温で約 2 時間保った後、ブッファーロート上で濾過して、アルギン酸固定化菌体を回収した。この固定化菌体を直径 3 0 mm、長さ 2 0 0 mm のジャケット付きガラスカラムに充填し、温度を 6 0 °C に保溫した。この固定化菌体カラムに pH 6. 5 のマルトース 4 0 % 溶液を S V 0. 2 にて下向流で通液し、トレハロース含量約 6 6 % の糖液を得た。本糖液を常法に従って、精製、濃縮し、噴霧乾燥してトレハロース含有粉末を固形物収率約 9 0 % で得た。本品は、低還元性で、温和な甘味を有し、実施例 A - 1 2 の場合と同様に各種組成物に有利に利用できる。

【0157】

【実施例 B - 1 甘味料】実施例 A - 8 の方法で得たトレハロース含水結晶粉末 1 重量部に、 α -グリコシルステビオシド (東洋精糖株式会社製、商品名 α G スイート) 0. 0 1 重量部及び L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル (商品名 アスパルチーム) 0. 0 1 重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約 2. 5 倍の甘味度を有し、甘味度当たりカロリーは、蔗糖の約 1 / 2. 5 に低下している。本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病者などのための低カロリー飲食物などに対する甘味付けに好適である。また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないとより、虫歯を抑制する飲食物などに対する甘味付けにも好適である。

【0158】

【実施例 B - 2 ハードキャンディー】濃度 5 5 % 蔗糖溶液 1 0 0 重量部に実施例 A - 1 の方法で得たトレハロース含有シラップ 3 0 重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分 2 % 未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸 1 重量部及び適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。本品は、歯切れ、呈味良好で、蔗糖の晶出も起こらない高品質のハードキャンディーである。

【0159】

【実施例 B - 3 チューインガム】ガムベース 3 重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに結晶マルチール粉末 3 重量部及び実施例 A - 3 の方法で得たトレハ

10

20

30

40

50

ロース含水結晶粉末 4 重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューインガムである。また、本品は、低う蝕性乃至難う蝕性チューインガムとして好適である。

【0160】

【実施例 B - 4 粉末ジュース】噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末 3 3 重量部に対して、実施例 A - 7 の方法で得た含蜜型トレハロース含水結晶粉末 5 0 重量部、蔗糖 1 0 重量部、無水クエン酸 0. 6 5 重量部、リシゴ酸 0. 1 重量部、L-アスコルビン酸 0. 1 重量部、クエン酸ソーダ 0. 1 重量部、ブルラン 0. 5 重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度 4 0 °C、風量 1 5 0 m³ とし、これに、実施例 A - 6 の方法で得たトレハロース含有シラップをバインダーとしてスプレーし、3 0 分間造粒し、計量、包装して製品を得た。本品は、果汁含有率約 3 0 % の粉末ジュースで、異味、異臭がなく、高品質を長期に保った。

【0161】

【実施例 B - 5 乳酸菌飲料】脱脂粉乳 1 7 5 重量部、実施例 A - 9 の方法で得たトレハロース含有シラップ 1 3 0 重量部及び特開平 4 - 2 8 1 7 9 5 号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末 5 0 重量部を水 1, 1 5 0 重量部に溶解し、6 5 °C で 3 0 分間殺菌し、4 0 °C に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターを 3 0 重量部植菌し、3 7 °C で 8 時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好な乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用をも有する。

【0162】

【実施例 B - 6 カスタードクリーム】コーンスター 1 0 0 重量部、実施例 A - 6 の方法で得たトレハロース含有シラップ 1 0 0 重量部、マルトース 8 0 重量部、蔗糖 2 0 重量部及び食塩 1 重量部を充分に混合し、鶏卵 2 8 0 重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳 1, 0 0 0 重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪拌を続け、コーンスターが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。本品は、なめらかな光沢を有し、温和な甘味で美味である。

【0163】

【実施例 B - 7 ういろうの素】米粉 9 0 重量部に、コーンスター 2 0 重量部、蔗糖 4 0 重量部、実施例 A - 1 1 の方法で得た含蜜型トレハロース含水結晶粉末 8 0 重量部及びブルラン 4 重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて 6 0 分間蒸し上げて抹茶うい

ろうを製造した。本品は、照り、口当たりも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良い。

【0164】

【実施例B-8 粉末ペプチド】40%食品用大豆ペプチド溶液(不二精油株式会社製造、商品名ハイニュートS)1重量部に、実施例A-10の方法で得たトレハロース含水結晶2重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、50℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は、風味良好で、プレミックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。

【0165】

【実施例B-9 粉末味噌】赤味噌1重量部に実施例A-4の方法で得た無水結晶トレハロース粉末3重量部を混合し、多数の半球状凹部を設けた金属板に流し込み、これを室温下で一夜静置して固化し、離型して1個当たり約4gの固形味噌を得、これを粉碎機にかけて粉末味噌を得た。本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。また、固形味噌は、固形調味料としてだけでなく味噌菓子などにも利用できる。

【0166】

【実施例B-10 粉末卵黄】生卵から調製した黄卵をプレート式加熱殺菌機で60乃至64℃で殺菌し、得られる液状卵黄1重量部に対して、実施例A-4の方法で得た無水結晶トレハロース粉末4重量部の割合で混合した後バットに移し、一夜放置して、トレハロース含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。本品は、プレミックス、冷菓、乳化剤などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

【0167】

【実施例B-11 あん】原料あずき10重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きして、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶ生あん約21重量部を得た。この生あんに、蔗糖14重量部、実施例A-12の方法で得たトレハロース含有シラップ5重量部及び水5重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げ、製品のあんを約35重量部得た。本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんパン、まんじゅう、だんご、もなか、氷菓などのあん材料として、好適である。

【0168】

【実施例B-12 パン】小麦粉100重量部、イースト2重量部、砂糖5重量部、実施例A-14の方法で得たトレハロース含有粉末1重量部及び無機フード0.1

重量部を、常法に従って、水でこね、中種を26℃で2時間発酵させ、その後30分間熟成し、焼き上げた。本品は、色相、すだちとともに良好で適度な弾力、温かな甘味を有する高品質のパンである。

【0169】

【実施例B-13 ハム】豚もも肉1,000重量部に食塩15重量部及び硝酸カリウム3重量部を均一にすり込んで、冷室に1昼夜堆積する。これを、水500重量部、食塩100重量部、硝酸カリウム3重量部、実施例10 A-3の方法で得たトレハロース含水結晶粉末40重量部及び香辛料適量からなる塩漬液に冷室で7日間漬込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、燻煙し、クッキングし、冷却、包装して製品を得た。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【0170】

【実施例B-14 加糖練乳】原乳100重量部に実施例A-5の方法で得たトレハロース含有シラップ3重量部及び蔗糖1重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度70%に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。本品は、温かな甘味で、風味もよく、乳幼児食品、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0171】

【実施例B-15 化粧用クリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-7の方法で得た含蜜型トレハロース含水結晶粉末2重量部、 α -グリコシルルチン1重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリン10重量部及び防腐剤の適量を常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部及び精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。本品は、安定性に優れ、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0172】

【実施例B-16 粉末薬用人参エキス】薬用人参エキス0.5重量部に実施例A-4の方法で得た無水結晶トレハロース粉末1.5重量部を混捏した後、バットに移し、2日間放置してトレハロース含水結晶に変換させブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、分級して粉末薬用人参エキスを得た。本品を適量のビタミンB1及びビタミンB2粉末とともに顆粒成型機にかけ、ビタミン含有顆粒状薬用人参エキスとした。本品は、疲労回復剤、強壮、強精剤などとして有利に利用できる。また、育毛剤などとしても利用できる。

【0173】

【実施例B-17 固体製剤】天然型ヒトインターフェロン- α 標品(株式会社林原生物化学研究所製、コスマ

・バイオ株式会社販売)を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロン- α 抗体カラムにかけ、該標品に含まれる天然型ヒトインターフェロン- α を吸着させ、安定剤である牛血清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pHを変化させて、天然型ヒトインターフェロン- α を実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有粉末を5%含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密濾過し、約20倍量の無水結晶マルトース粉末(株式会社林原商事製、商品名ファイントース)に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、1錠(約20.0mg)当たり天然型ヒトインターフェロン- α を約1.50単位含有する錠剤を得た。本品は、舌下錠などとして、一日当たり、大人1乃至10錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リューマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利に利用できる。本品は、トレハロ

配合

第2リン酸カルシウム	45.0%
ブルラン	2.95%
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5%
グリセリン	20.0%
ポリオキシエチレンソルビタンラウレート	0.5%
防腐剤	0.05%
実施例A-14の方法で得たトレハロース含有粉末	12.0%
マルチトール	5.0%
水	13.0%

上記の材料を常法に従って混合し、練歯磨を得た。本品は、適度の甘味を有しており、特に子供用練歯磨として好適である。

【0176】

【実施例B-20 流動食用固体製剤】実施例A-8の方法で製造したトレハロース含水結晶50.0重量部、粉末卵黄27.0重量部、脱脂粉乳20.9重量部、塩化ナトリウム4.4重量部、塩化カリウム1.8重量部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0.01重量部、アスコルビン酸ナトリウム0.1重量部、ビタミンEアセテート0.6重量部及びニコチン酸アミド0.04重量部からなる配合物を調製し、この配合物25グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。本品は、1袋分を約15.0乃至30.0mlの水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。

【0177】

【実施例B-21 輸液剤】実施例A-10の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶を水に濃度約10w/v%に溶解し、次いで、常法に従って、精密濾過してバイロジエンフリーとし、プラスチック製ボトルに無菌的に充填し施栓して製品を得た。本品は、経日変化もな

ースと共にマルトースが安定剤として作用し、室温で放置してもその活性を長期間よく維持する。

【0174】

【実施例B-18 糖衣錠】重量150mgの素錠を芯剤とし、これに実施例A-3の方法で得たトレハロース含水結晶粉末4.0重量部、ブルラン(平均分子量20万)2重量部、水3.0重量部、タルク2.5重量部及び酸化チタン3重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約23.0mgになるまで糖衣し、次いで、同じトレハロース含水結晶粉末6.5重量部、ブルラン1重量部及び水3.4重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

【0175】

【実施例B-19 練歯磨】

く安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などに投与するのに好適である。本品は濃度10w/v%で血液と等張で、グルコースの場合の2倍濃度でエネルギー補給できる。

【0178】

【実施例B-22 輸液剤】実施例A-13の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶と下記の組成のアミノ酸配合物とがそれぞれ5w/v%、30w/v%になるように水に混合溶解し、次いで実施例10と同様に精製してバイロジエンフリーとし、更に、プラスチック製パックに充填し施栓して製品を得た。

アミノ酸配合物の組成(mg/100ml)

L-イソロイシン	180
L-ロイシン	410
L-リジン塩酸塩	620
L-メチオニン	240
L-フェニルアラニン	290
L-スレオニン	180
L-トリプトファン	60
L-バリン	200
L-アルギニン塩酸塩	270
L-ヒスチジン塩酸塩	130
グリシン	340

50 本品は、糖質とアミノ酸との複合輸液剤にもかかわら

ず、トレハロースが還元性を示さないため、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などへ投与するのに好適である。本品は、生体へのエネルギー補給のみならず、アミノ酸補給のためにも有利に利用できる。

【0179】

【実施例B-23 外傷治療用膏薬】実施例A-2の方法で製造したトレハロース高含有粉末200重量部及びマルトース300重量部に、ヨウ素3重量部を溶解したメタノール50重量部を加え混合し、更に10w/v%ブルラン水溶液200重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、トレハロースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから、治癒期間が短縮され、創面もきれいに治る。

【0180】

【発明の効果】上記から明らかなように、本発明の新規マルトース・トレハロース変換酵素は、マルトースからトレハロースへ高変換率で転換する。この酵素反応で得られるトレハロースとこれを含む糖質は、安定であり、良質でさわやかな甘味を有しており、また、経口摂取により消化吸収され、カロリー源となる糖質である。これら糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、飲食物、化粧品、医薬品、など各種組成物に有利に利用できる。

【0181】従って、本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉に由来するマルトースから、トレハロースとこれを含む糖質を、工業的に大量かつ安価に供給できる全く新しい道を拓くことになり、それが与える影響の大きさは、澱粉科学、酵素化学、生化学などの学問分野は言うに及ばず、産業界、とりわけ、食品、化粧品、医薬品分野は勿論のこと、農水畜産業、化学工業にも及び、これら産業界に与える工業的意義は、計り知れないものがある。

【図面の簡単な説明】

【図1】ピメロバクター・スピーシーズ R48のマル

トース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図2】ピメロバクター・スピーシーズ R48のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図3】ピメロバクター・スピーシーズ R48のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

10 【図4】ピメロバクター・スピーシーズ R48のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図5】シュードモナス・プチダ H262のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図6】シュードモナス・プチダ H262のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

20 【図7】シュードモナス・プチダ H262のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図8】シュードモナス・プチダ H262のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

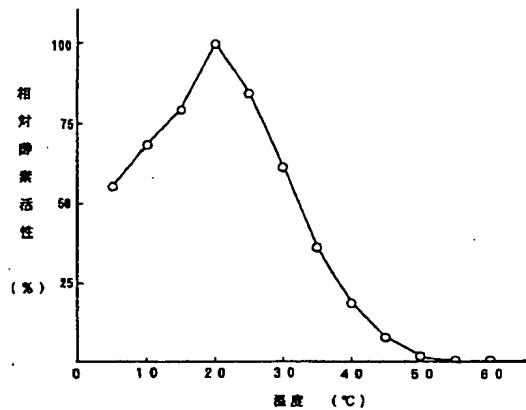
【図9】サーマス・アクアティカス ATCC3392 3のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図10】サーマス・アクアティカス ATCC3392 3のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

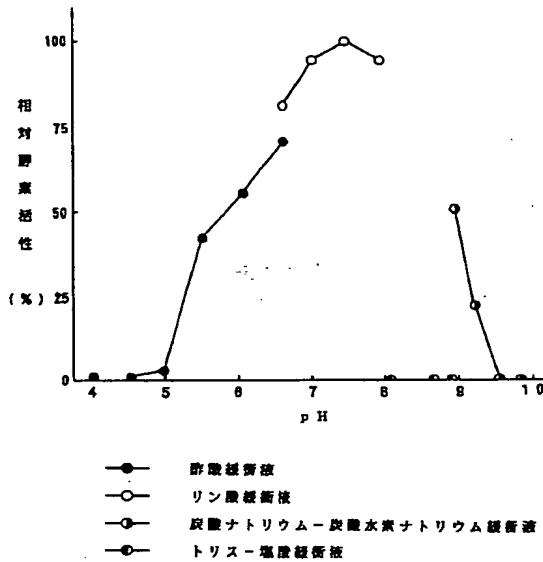
30 【図11】サーマス・アクアティカス ATCC3392 3のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図12】サーマス・アクアティカス ATCC3392 3のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

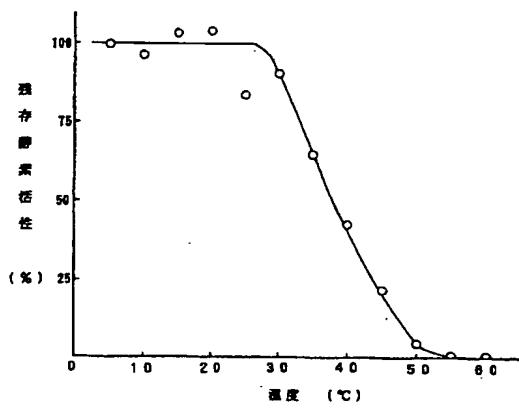
【図1】



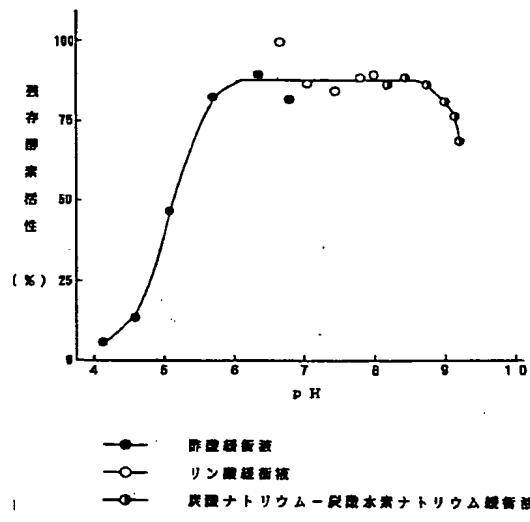
【図2】



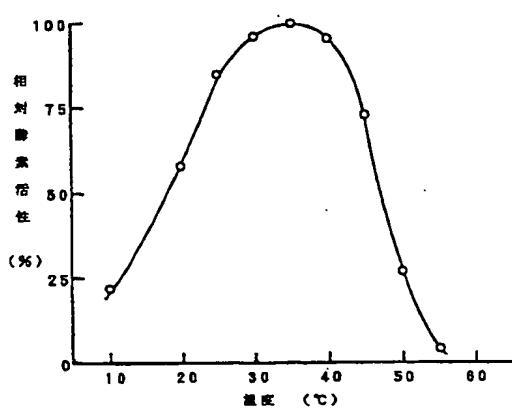
【図3】



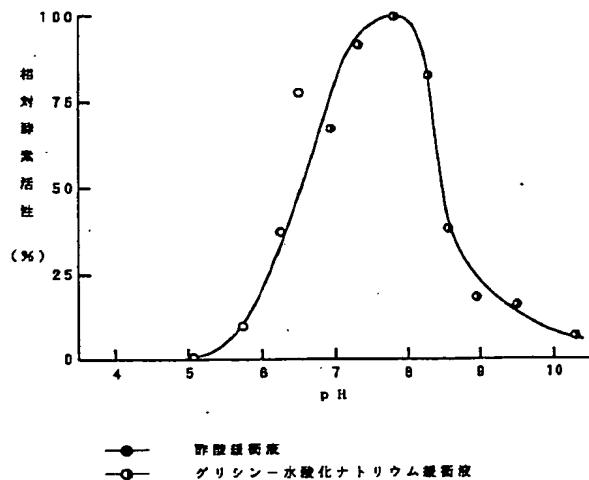
【図4】



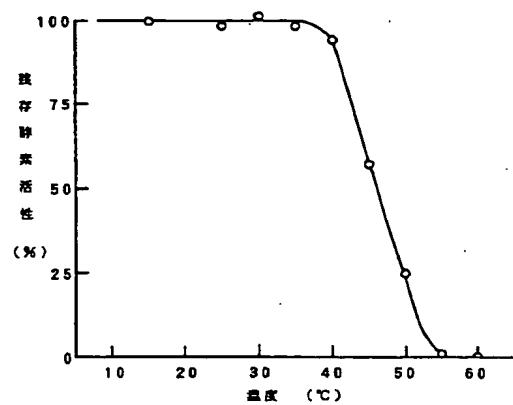
【図5】



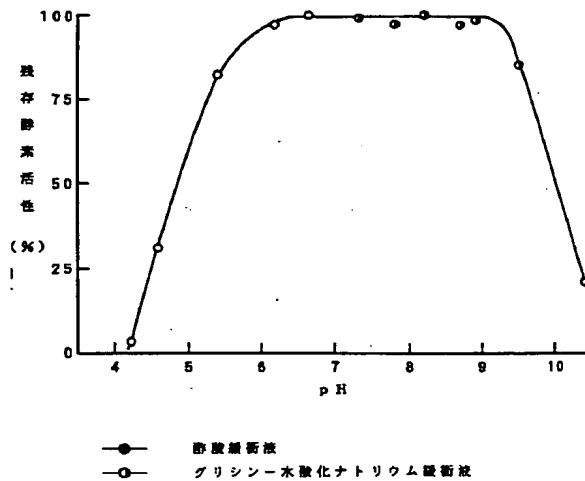
【図6】



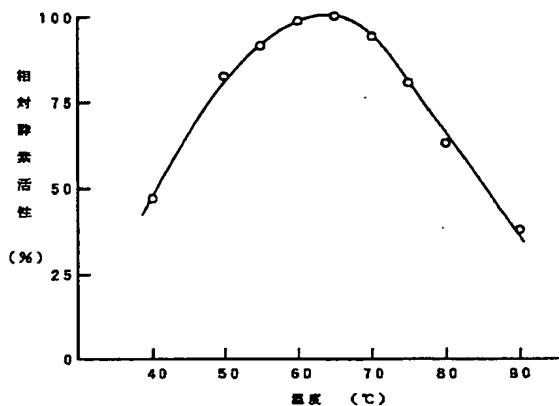
【図7】



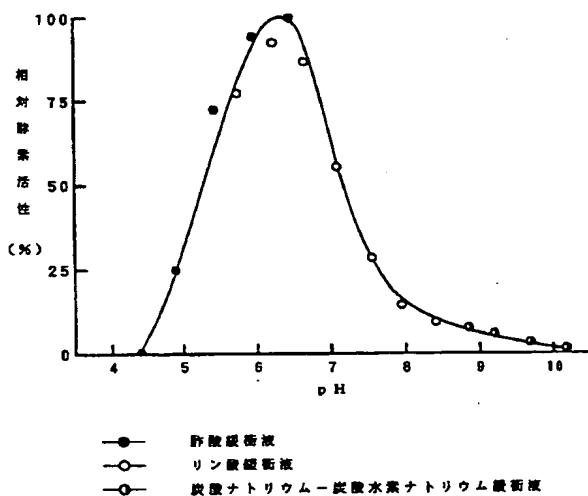
【図8】



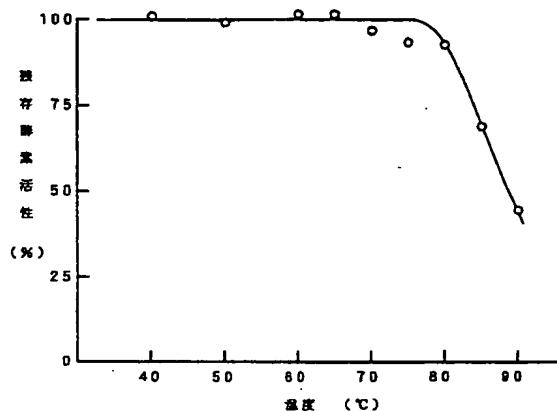
【図9】



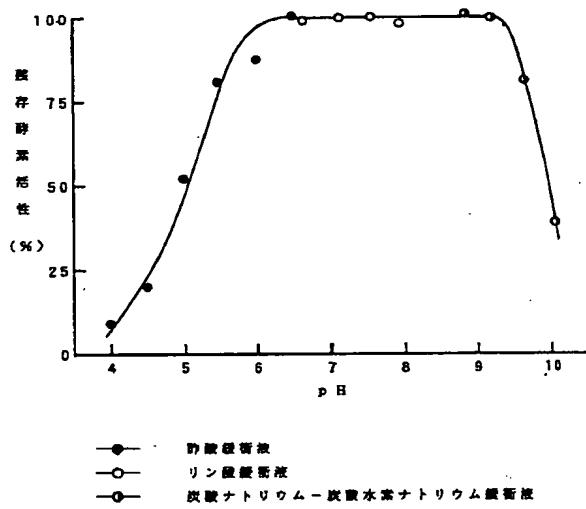
【図10】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

106

3/02

3/30

A23L 1/202

118

1/31

1/32

2/39

A

A

A61K 7/16

7/42

9/06

9/08

J

9/20

9/36

31/70

C07H 3/04

C12N 1/20

A 8828-4B

C12P 19/14

Z 7432-4B

//(C12N 9/10

C12R 1:01)

(C12N 9/10

C12R 1:40)

(C12N 1/20

C12R 1:01)

(C12N 1/20

C12R 1:40)

A23L 2/00

Q